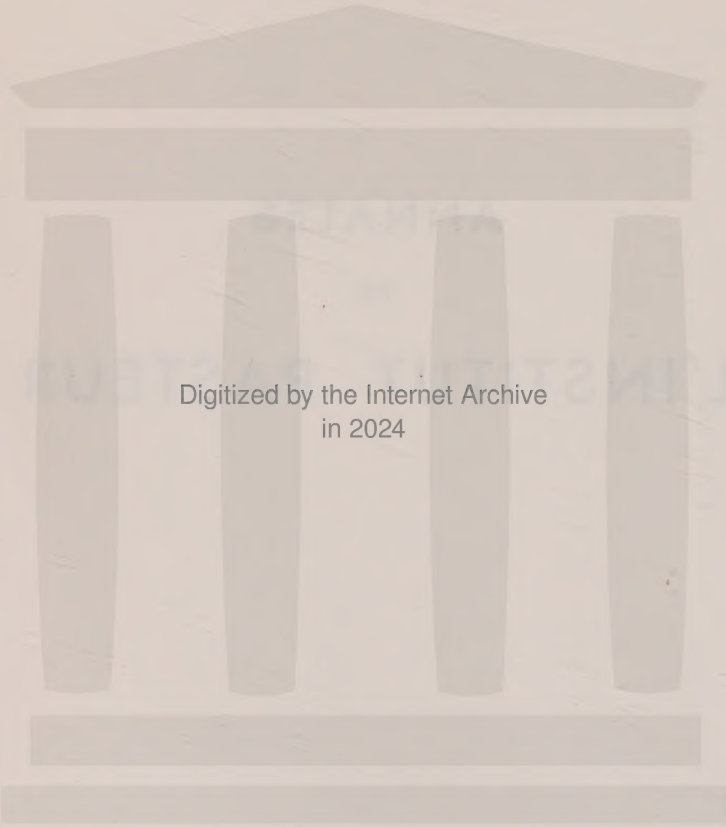


ANNALES  
DE  
L'INSTITUT PASTEUR



Digitized by the Internet Archive  
in 2024

# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

PUBLIÉES PAR

LA DIRECTION DE L'INSTITUT PASTEUR

Avec le concours des Chefs de Service  
et des Chefs de Laboratoire

Secrétaire général : J. Fournier

---

TOME CENT UNIÈME  
Juillet-Décembre 1961

---

QR

1

A475

v.101

July-Dec.

1961

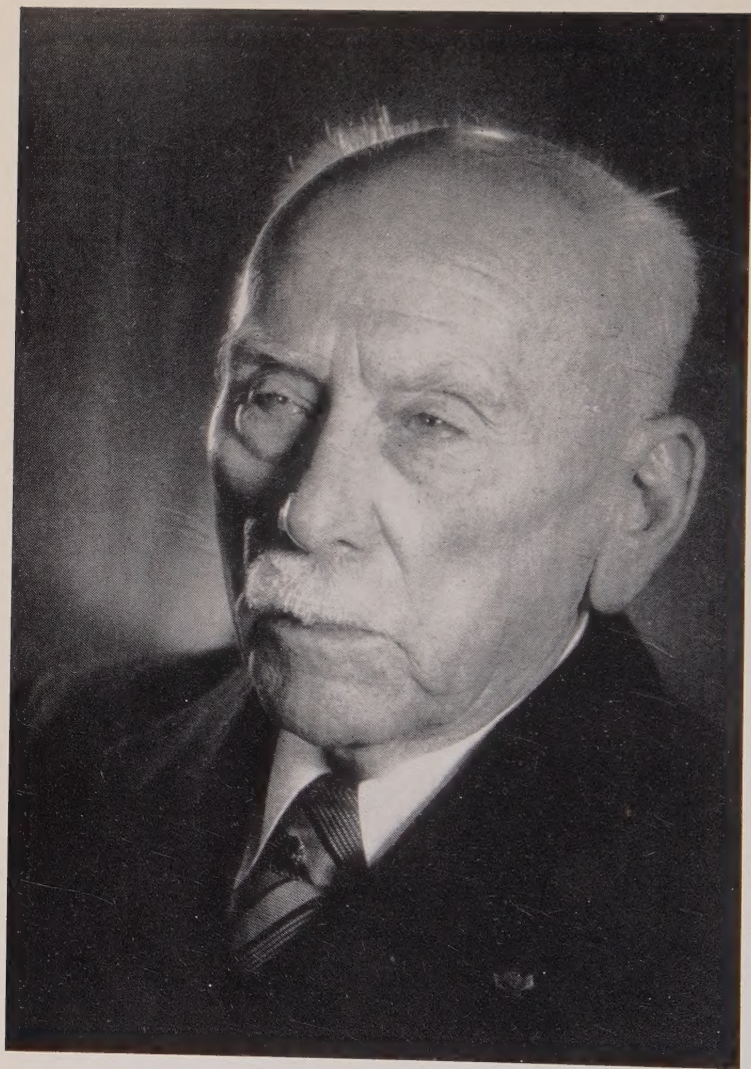
PER

MASSON ET C<sup>IE</sup>, ÉDITEURS  
Libraires de l'Académie de Médecine  
120, Boulevard Saint-Germain  
PARIS

PARIS. — ANCIENNE IMPRIMERIE DE LA COUR D'APPEL, 1, RUE CASSETTE. — 1961







JULES BORDET  
(1870-1961)

# ANNALES

DE

# L'INSTITUT PASTEUR

---

**JULES BORDET**

(13 juin 1870 - 6 avril 1961)

Jules Bordet n'est plus.

Mais devons-nous faire dater son entrée dans l'immortalité de ce jour d'avril 1961 où il expira ?

Son immortalité n'a-t-elle pas débuté avec ses étonnantes découvertes, qui ont fait de sa vie une suite exceptionnelle de brillantes réussites, n'a-t-elle pas progressé avec le rayonnement croissant de sa personnalité, ne s'est-elle pas affirmée au cours de sa longue vie avec le charme pénétrant de son éloquence, de sa bonhomie extraordinairement noble et de son humanité qui a si profondément frappé tous ceux qui l'ont connu ?

Tout a été dit sur sa vie, ses découvertes, la gloire qui est attachée à son nom, dans les quatre admirables discours qui ont été prononcés à Bruxelles, le 25 novembre 1950, le jour de la célébration officielle de son jubilé, et sont consignés — *verba volant, scripta manent* — dans le volume jubilaire que l'Institut Pasteur de Paris, sa Maison-mère, lui a dédié et qui figurent *in extenso* dans ces Annales (1).

(1) *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **79**, 479 et suiv.



On pourrait donc croire qu'après une nouvelle lecture de cette biographie complète, il n'y avait plus de place pour un ultime éloge. Ce serait mal connaître l'avidité de tout être pensant pour l'épopée et l'attrait qu'a pour nous la vie des hommes illustres.

Car la vie de Jules Bordet, le plus illustre des disciples de l'Ecole pasteurienne, est bien un conte merveilleux, qu'on ne se lassera jamais de répéter, de réécrire et de relire. Et, comme tout conte, il peut commencer par ces quatre petits mots classiques : « Il était une fois » un petit garçon aux yeux bleus et au sourire charmant qui naquit à Soignies en 1870, et qui, à 13 ans, était fasciné par la chimie à un tel point qu'il transforma en laboratoire une mansarde dans la maison de son père, contraignant sa famille à vivre dans la terreur d'une explosion ou d'un incendie. Cette vocation enfantine eût-elle déterminé son avenir qu'il serait sans nul doute devenu un génial chimiste. Mais la sagesse de son père, qui lui voulut une carrière moins aléatoire, l'orienta vers la médecine, et il entra à 16 ans à l'Ecole de Médecine de l'Université libre de Bruxelles. Mais, à peine son doctorat terminé, il préféra à la médecine une science médicale, la bactériologie naissante, déjà nimbée d'une auréole de gloire, et obtint pour venir l'étudier à la source, une bourse de voyage, qui lui permit d'entrer à l'Institut Pasteur en avril 1894.

Jules Bordet avait alors 24 ans. Pasteur achevait douloureusement sa vie prestigieuse. Déjà ses disciples, Duclaux, Roux, Chamberland, Yersin, Metchnikoff, Calmette, animaient vigoureusement notre Maison et étonnaient le monde par leurs retentissantes découvertes. Ce jeune homme, en apparence timide et distrait (ainsi le décrit Paul de Kruif) allait les égaler rapidement et devenir encore plus célèbre qu'eux.

Cette ascension fulgurante a été bien évoquée par L. Pasteur Valléry-Radot en deux courtes phrases : « En cinq ans, Monsieur, vous êtes devenu un biologiste hors pair ; vos découvertes sensationnelles ont fait de vous à 30 ans un des savants les plus illustres d'Europe. »

Ces découvertes, tous les Pasteuriens les connaissent et il n'est pas question de les commenter ici ; elles constituent, comme l'ont dit plusieurs auteurs, « la bible de l'Immunologie ».

Comme dans la crypte où repose Louis Pasteur, haut lieu de pèlerinage mondial, on peut les inscrire brièvement comme une épitaphe, avec simplement leur titre et leur chronologie ;

1895 : Séro-agglutination des vibrions cholériques.

1895 : Synergie de l'alexine et de la sensibilisatrice.

1896-1899 : Rôle des électrolytes dans l'agglutination. Mécanisme humoral de la bactériolyse.

1897 : Mission en Afrique du Sud sur la peste bovine.

- 1898 : Mode d'action des sérums hémolytiques.
- 1899 : Séro-précipitation des albumines animales.
- 1900 : Réaction de fixation de l'alexine et son application au séro-diagnostic de la fièvre typhoïde, de la peste, du charbon et du rouget (1901), de la tuberculose (1903).
- 1900 : Création et Direction de l'Institut Pasteur du Brabant.
- 1900-1904 : Séro-diagnostic des espèces animales.
- 1903 : Excito-production par la thrombine et réaction autocatalytique.
- 1904 : Diagnostic médico-légal des taches de sang.
- 1906 : Découverte du microbe de la coqueluche « *Bordetella pertussis* ».
- 1909 : Découverte de la congglutination et de la coagglutination.
- 1909-1910 : Description morphologique du germe de la péri-pneumonie bovine.
- 1910 : Variabilité antigénique au sein d'une espèce microbienne.
- 1911 : Mécanisme de formation de la thrombine.
- 1913 : Transformation du sérum frais en anaphylatoxine.
- 1914-1918 : Traité de l'Immunité dans les maladies infectieuses.
- 1919 : Mise au point de l'antigène de Bordet et Ruelens. Rôle du prosérozyme, du sérozyme et du cytozyme dans la coagulation du sang.
- 1920 : Recherches sur la bactériophagie et la lysogénie.
- 1924 : Purification du lysozyme.
- 1926 : Spécificité des lipides des hématies.
- 1930 : Rôle du calcium dans la variabilité microbienne.
- 1932 : Rôle de l'alexine dans le renforcement de la virulence microbienne.
- 1939 : Nouvelle édition du Traité de l'Immunité.

Une telle explosion de découvertes avait valu à leur auteur les plus hautes récompenses dont la plus marquante fut le Prix Nobel de Médecine, qu'il reçut en 1919-1920. Toutes les Académies ont tenu à honneur de l'avoir pour membre. Toutes les grandes Universités lui ont décerné des titres *honoris causa*. Tous les grands Ordres de Chevalerie l'ont promu dans leurs grades les plus élevés : mais aucun savant n'a supporté autant d'honneurs et de récompenses avec une si sincère modestie, une si souriante gratitude.

Après tant d'autres admirateurs et chroniqueurs de sa vie et de ses mérites, nous ne pouvons omettre ici un des attraites les plus unanimement reconnus de sa personnalité : son éloquence simple, droite, directe, la clarté lumineuse de son enseignement, soit comme professeur à l'Université de Bruxelles ou à l'Institut Pasteur de Paris, soit comme conférencier appelé de tous côtés



en Europe et en Amérique, soit enfin comme orateur de discours officiels, dont deux en particulier retentissent encore aux oreilles de ceux qui ont eu le bonheur de l'entendre, l'un, le discours d'ouverture du 1<sup>er</sup> Congrès international de Microbiologie, dans le Grand Amphithéâtre de l'Institut Pasteur en juillet 1930 ; l'autre, l'improvisation qu'on lui avait arrachée au cours de la célébration du cinquantenaire de la mort de Pasteur, dans le Grand Amphithéâtre de la Sorbonne et qui suscita une telle émotion que toute l'assistance, debout, lui fit une ovation interminable.

Dans son discours jubilaire en 1950, son fidèle collaborateur E. Renaud terminait par ces mots : « *Ad multos annos* ». Nous sommes sûrs que ce souhait se transposera à partir d'avril 1961 sur le plan de l'immortalité spirituelle : comme tous les grands disciples de Pasteur dont il était resté le dernier et le plus célèbre, Jules Bordet vivra éternellement dans nos mémoires et dans celles de nos descendants. Certes la douleur de sa mort corporelle accable à juste titre ses enfants, ses petits-enfants, sa famille et nous la partageons largement. Mais avec eux nous ressentons aussi l'immense fierté de l'avoir eu parmi nous si longtemps, d'en avoir été l'élève, de pouvoir chaque jour consulter son Traité de l'Immunité, toujours actuel, de pratiquer journallement la réaction de Bordet et Gengou, de passer devant son laboratoire, au deuxième étage du Bâtiment B, devenu lieu historique, comme celui de Metchnikoff. Les pèlerinages quotidiens de l'Institut Pasteur comporteront maintenant une station de plus : après la crypte et le musée L. Pasteur, après le tombeau de Monsieur Roux, après le laboratoire de Metchnikoff, celui de Jules Bordet deviendra pour les biologistes du monde entier, le haut lieu où ils viendront se souvenir et méditer.

A.-R. P.

---

# ENQUÊTE SUR LES FOYERS DE DISTOMATOSE HÉPATIQUE DE LA VALLÉE DU LOT

## II. PROPHYLAXIE.

par R. DESCHIENS, Y. LE CORROLLER et R. MANDOUL (\*).

(*Institut Pasteur, Service de Parasitologie,  
Faculté de Médecine de Bordeaux, Laboratoire de Parasitologie*)

Dans le cadre des méthodes prophylactiques pouvant être appliquées à une maladie parasitaire comportant un cycle évolutif comprenant : 1° *un réservoir de virus* (ovins, bovins) contaminant, pour la limnée, par ses déjections (œufs de douves, miracidiums) ; 2° un mollusque aquatique *hôte intermédiaire*, la limnée, contaminant par l'issue de cercaires de douves s'enkystant sur des végétaux immergés ; 3° des *réceptifs*, l'homme, les ovins, les bovins, contaminés par l'ingestion de crudités ; les mesures suivantes doivent être discutées :

### DISPOSITIONS CONCERNANT LE BÉTAIL RÉSERVOIR DE VIRUS.

1° Le traitement et la déparasitation des ovins et des bovins qui sont à l'origine des contaminations humaines est un problème de médecine vétérinaire qui, en principe, peut être abordé, étant donné que l'extrait éthéré de fougère mâle (5 g par jour, pendant trois jours chez le mouton, dose six à huit fois plus forte chez le bœuf) et surtout le tétrachlorure de carbone, très bon marché (2 doses de 1 ml à trois jours d'intervalle *per os* chez le mouton), sont actifs et peuvent être administrés systématiquement à tous les animaux, au printemps, par exemple.

Cependant, dans la pratique, le traitement de 70 p. 100 environ (pratiquement la totalité) de la population d'un troupeau qui, dans l'ensemble, compense bien sa distomatose, fournit une viande de bonne qualité, et est de ce fait rentable, représente, pour le propriétaire une dépense importante dont la nécessité *a priori* ne

(\*) Manuscrit reçu le 13 février 1961.

lui apparaît pas. Or, le traitement massif et efficace des troupeaux ou du cheptel (2 ml de tétrachlorure de carbone par mouton), s'il est onéreux pour un propriétaire, l'est beaucoup moins pour la collectivité ; aussi, si une proposition, pour contribuer à la lutte endémo-épidémique locale du Lot et du Lot-et-Garonne, devait être faite dans ce sens, la dépense de sa réalisation devrait être assurée par les coopératives ou par les départements.

2° La réglementation des entrées de bestiaux contaminés dans le département pourrait être limitante des causes d'infestation si on était en présence d'un cheptel local peu parasité, mais nous savons que 70 p. 100 des ovins de la région sont porteurs plus ou moins tolérants de doutes ; le réservoir de virus est sur place ; la région sous revue est peut-être même, pour partie, exportatrice de distomatose. La portée d'un contrôle des importations apparaît donc comme d'un intérêt restreint, au moins pour le Lot.

3° Le contrôle des issues et des eaux usées des tueries privées ou des abattoirs devra être surveillé, afin que des produits contaminateurs ne reviennent pas par cette voie aux limnées contaminantes, mais c'est là une source d'infestation secondaire.

4° *La protection sanitaire des cressonnières vis-à-vis du bétail contamineur et de ses déjections* est le poste essentiel de la campagne prophylactique, aussi discuterons-nous dans le détail les modalités de son application dans les foyers prospectés.

Les animaux domestiques contamineurs, moutons et bovins, sont nécessairement amenés, pour boire, dans les points d'eau naturels ou aménagés par l'homme (sources, ruisseaux, canaux, mares, étangs) qu'ils rencontrent dans leurs déplacements ou près desquels il pâturent et défèquent « quand l'occasion se présente ». Cette circonstance contaminante est inévitable sur le plan rural et échappe évidemment à toute réglementation.

*C'est donc dans le sens d'une mise hors d'atteinte du bétail et de ses déjections, des points d'eau ou des cultures inondées, dans lesquelles se développent les végétaux consommés crus par l'homme, que la prophylaxie doit surtout s'exercer.*

Le périmètre des sources ou des biefs d'amont (souillure à distance par les eaux de ruissellement) alimentant les cultures et les cressonnières doit être protégé par des grillages, des palissades, des pieux à fils de fer barbelés ou des haies épineuses contre les incursions du bétail ; ceci n'engage les exploitants qu'à des dépenses facilement compensées par les bénéfices d'exploitation. Cette protection n'est évidemment pas valable contre les eaux de ruissellement et les écoulements de purins, d'issues d'étables, ou de parcs à animaux, aussi ne doit-on pas se contenter d'un



obstacle direct à la pénétration des animaux dans les cressonnières et doit-on créer un périmètre de protection *rigoureux*, calculé de telle manière que les eaux de ruissellement provenant de pâturages sur lesquels sont parqués de animaux réservoirs de virus possibles ne puissent atteindre les cultures.

Les auxiliaires sanitaires ont tendance à négliger une telle disposition et à se contenter de la mise en place de clôtures se bornant à empêcher l'intrusion des animaux dans les cressonnières à protéger. Or, ceci peut être satisfaisant à l'œil ou à un observateur superficiel, mais n'est pas suffisant.

Les mesures arrêtées en Lot-et-Garonne dans le sens de la protection des cressonnières sont, dans l'ensemble, efficaces ; elles sont tout à fait satisfaisantes dans l'arrondissement préfectoral d'Agen, dans la vallée de la Garonne, où sont établies des surfaces de culture maraîchères et des cressonnières modèles particulièrement rentables et exportatrices de cresson et de primeurs.

L'approvisionnement en eau de ces cultures est réalisé par des sources à périmètre protégé ou par des stations, le plus souvent électriques, de pompage, à partir de puits correspondant à des nappes d'eau sans communication directe avec la Garonne. Ces cultures sont contrôlées avec efficacité par la Direction départementale de la Santé et c'est très légitimement que 41 cressonnières de ce territoire sont « autorisées » par la préfecture du Lot-et-Garonne.

Soulignons ici que la discrimination entre les cressonnières « autorisées », c'est-à-dire pour lesquelles les autorités sanitaires se portent garantes, et les cressonnières refusées par la Direction départementale de la Santé, devrait avoir une portée commerciale telle que seuls les bons maraîchers, porteurs d'une attestation, soient admis à exporter et à vendre leur récolte aux magasins d'alimentation ou sur les marchés. Les populations éprouvées par la distomatose ont intérêt à demander cette garantie et elles le font, le plus souvent, spontanément.

Les cressonnières de la vallée du Lot, et en particulier, celles de l'arrondissement de Villeneuve-sur-Lot ne sont pas, dans l'ensemble, suffisamment protégées et une seule d'entre elles a été « autorisée ». Les maraîchers de cette fertile vallée comprendront certainement qu'ils ont intérêt à prendre les mesures efficaces adoptées par leurs collègues de l'arrondissement d'Agen.

5° Dans le cas particulier de l'endémo-épidémie de distomatose du Lot-et-Garonne, le rôle de la contamination des cressonnières par les *fumiers*, et singulièrement le crottin de mouton utilisé comme engrais, est à considérer.

Les grandes exploitations de cressiculture utilisent des engrais chimiques fabriqués, mais les petits maraîchers ont souvent

recours aux fumiers et, en particulier, aux fumiers de mouton, pour fertiliser leurs cultures.

Il y a là un risque très important de contamination des cressonnières : en effet, il ne suffit pas, comme nous l'avons dit, d'empêcher le transport naturel, par les eaux de ruissellement, des œufs contamineurs en protégeant les cressonnières, il faut aussi éviter que des crottins fertilisants, contenant des œufs de douves, soient apportés pour ainsi dire « à domicile » dans les cultures. Si on ajoute à cela que les cressonnières de fortune, fertilisées de cette manière, ne sont généralement pas contrôlées et que la récolte est vendue, clandestinement, de « porte en porte », on pourra apprécier le danger qu'elles représentent.

Le mieux serait d'interdire l'exploitation des cressonnières et des cultures maraîchères ainsi traitées. L'engrais animal est évidemment un des meilleurs engrais : c'est une richesse agricole utilisée dans toutes les campagnes de France ; néanmoins, cet engrais n'est pas recommandable en culture maraîchère et il ne saurait être toléré sans que les conditions de son emploi soient très bien définies.

Nous avons recherché quels étaient les délais de survie et de conservation du pouvoir infectieux (libération des miracidiums) des œufs de *Fasciola hepatica* dans les crottins de mouton conservés dans des enceintes étanches et réduits de ce fait à l'état de purin et de coprolysat.

La conservation des œufs de *Fasciola hepatica* dans un fumier-purin expérimental, constitué par une macération de foin (1 volume) et de crottin frais de mouton (1 volume), montre qu'après trente jours, aucune éclosion n'est observée, alors que dans des témoins représentés par des œufs de *F. hepatica*, séparés par tamisage des crottins et conservés dans l'eau, tous les œufs éclosent en huit à quinze jours.

Cependant, à six mois de séjour dans un fumier-purin, quelques œufs sont encore capables de poursuivre leur développement et de libérer un miracidium si on les transfère en eau claire. Lorsque les œufs ont été conservés pendant six mois dans le fumier-purin, ils sont presque tous dégénérés.

On peut théoriquement admettre qu'un fumier, conservé pendant six mois, constitue un engrais non contamineur des cultures maraîchères sur lesquelles il serait répandu.

Il ressort de ces constatations qu'on pourrait, à la rigueur, du point de vue de la prophylaxie de la distomatose, et sous réserve de risques d'autres contaminations microbiennes et parasitaires, autoriser l'emploi en culture maraîchère ou en cressiculture, après une conservation sans apports nouveaux de

plus de six mois, de crottins de moutons en fosses cimentées étanches ; mais l'utilisation des engrais chimiques reste, naturellement plus indiquée sur le plan sanitaire.

Nous ne rappellerons que pour mémoire les *actions* molluscicides chimiques ayant pour fin la destruction des mollusques vecteurs de la distomatose (sulfate de cuivre, pentachlorophénate de sodium, chlorure et carbonate de baryum) ; une telle mesure serait très onéreuse et peu opérante étant donné la dissémination des limnées dans la nature et leur tendance amphibie ; elle aurait, en outre, des conséquences économiques et touristiques fâcheuses sur la flore, la faune et la potabilité humaine et animale des collections d'eaux naturelles ou domestiquées.

#### EDUCATION ET RÉGLEMENTATION SANITAIRES.

*L'éducation sanitaire* des populations des territoires dans lesquels sévit particulièrement la distomatose hépatique, est un poste très important des mesures prophylactiques. Comme il s'agit de la protection de la santé de chacun, le bon sens et la crainte d'un risque infectieux devraient faire admettre les dispositions sanitaires recommandées. L'expérience montre cependant que pour qu'une telle position soit obtenue, il faut enseigner aux intéressés les dangers qu'ils courent.

L'éducation sanitaire devra s'exercer, d'abord, chez les exploitants maraîchers, les petits cultivateurs, les marchands de primeurs qui, de bonne foi, consommant leurs récoltes, sont aussi exposés que leurs chalands, comme nous en avons montré ici plusieurs exemples. L'explication de ce qu'est la distomatose aux intéressés les dangers qu'ils courent.

En ce qui concerne le programme éducatif, les procédés simples et clairs, suggestifs et récréatifs, sont les meilleurs ; les nuances humoristiques sont souvent les bienvenues. On peut prévoir : affiches, images (cycle évolutif expliqué de la maladie), leçons de choses, présentation de foies douvés, de cresson contaminé, de limnées, de photographies et de films cinématographiques de 16 mm de court métrage (films d'éducation sanitaire de l'Institut Pasteur) pouvant être projetés avec un équipement simple et itinérant à un petit auditoire.

On insistera sur le préjudice commercial que cause, à celui qui l'a vendue, la fourniture d'un cresson reconnu contaminant.

Ces campagnes d'éducation sanitaire peuvent être menées à peu de frais, le personnel appelé à y participer comportant surtout des fonctionnaires de l'Etat, des communes ou des collectivités, déjà rémunérés en cette qualité (médecins de la Santé publique, médecins des écoles, assistantes sociales, assis-

tantes sociales rurales, instituteurs) ou des volontaires plus ou moins bénévoles (infirmières, personnel de la Société de la Croix-Rouge Française, membres du clergé); bien coordonnées et conduites avec un intelligent dévouement, elles apportent pratiquement toujours de bons résultats.

*La réglementation de la culture et de la vente du cresson* et des légumes consommés crus, préconisée, dès 1950, par Lavier [4] est un corollaire, de caractère impératif, de la moralisation sanitaire. Elle intéresse non seulement la prophylaxie de la distomatose, mais aussi celle de parasitoses communes (ascaridiose, oxyurose) et de diverses infections microbiennes (salmonelloses, shigelloses). Les autorités départementales et municipales sont habilitées et armées pour prendre des arrêtés relatifs à une telle réglementation et pour « agréer » ou « interdire » sur le plan sanitaire les cressonnières ou les cultures de légumes consommés crus ne répondant pas à une protection suffisante.

La réglementation à appliquer doit surtout s'inspirer des dispositions sur le terrain développées, ici, à propos de la protection sanitaire des cressonnières.

La qualification de produits provenant de cressonnières agréées ou de cultures agréées, doit être recherchée par une clientèle avertie et les cultivateurs avisés doivent comprendre que l'« agrément administratif » est de nature à faciliter leur commerce en donnant légitimement confiance aux chalands.

#### RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Après des considérations générales épidémiologiques et cliniques sur la distomatose hépatique à *Fasciola hepatica* chez l'homme en France et sur sa répartition géographique dans les provinces et dans les départements français (1), les conditions du dépistage d'un foyer endémo-épidémique de la vallée du Lot, ayant intéressé plus de 200 personnes, sont décrites (état infectieux, fébrile, avec hyperéosinophilie, épreuves sérologiques). Les examens sérologiques, et en particulier la réaction de fixation du complément avec l'antigène distomien stabilisé de l'Institut Pasteur, permettent l'identification des cas avant l'apparition des œufs, fait important sur le plan thérapeutique.

Les enquêtes épidémiologiques ont établi que l'insuffisance de la protection sanitaire de certaines cressonnières, ou de certaines cultures maraîchères, contre les déjections des bovins ou des ovins (souillure directe ou de voisinage par défécation, pollution par les eaux de ruissellement ou les purins, utilisation des fumiers ou des crottins comme engrais) et que les ventes clandestines de

(1) La Corse est à ajouter à la liste des départements contaminés.



cresson provenant de cultures non agréées étaient à l'origine des contaminations.

Les mesures de prophylaxie appliquées ou proposées sont les suivantes dans l'ordre d'efficacité :

1° *La protection sanitaire des cressonnières* vis-à-vis du bétail contaminateur et de ses déjections, poste essentiel comportant :

a) l'établissement obligatoire d'une enceinte d'interdiction (grillage, palissades, haies épineuses) ;

b) l'interdiction d'installation de pâturages et d'étables contigus aux cultures et aux sources d'irrigation ou en rapport possible avec elles par des eaux de ruissellement ;

c) l'utilisation exclusive des engrais chimiques et l'interdiction de l'emploi des fumiers.

2° *L'éducation sanitaire* suggestive et récréative (affiches, images, bulletins, leçons de choses, présentations d'organes douvés, photographies, petits films cinématographiques itinérants) suivant un programme pratique et peu onéreux.

3° *La réglementation administrative* de la culture et de la vente du cresson (cressonnières et cressons « agréés », cressonnières et cressons « interdits », surveillance sanitaire des cressonnières et des marchés).

4° *La déparasitation* du bétail contaminateur (ovins, bovins).

5° *La destruction* (avec réserves) des mollusques vecteurs (limnées).

## SUMMARY

### SURVEY OF HEPATIC DISTOMATOSIS IN THE LOT VALLEY.

#### I. EPIDEMIOLOGICAL STUDIES. — II. PROPHYLAXIS.

After a general epidemiological and clinical study of human hepatic distomatosis induced in France by *Fasciola hepatica*, and its distribution in the various French regions, the demonstration of an endemo-epidemic focus in the Lot Valley (over 200 persons were implied) is described. The serological survey, and particularly the complement fixation reaction with the Pasteur Institute antigen, allowed the diagnostic before the appearance of the parasite eggs, an important result from the therapeutical viewpoint.

This epidemiological survey proved that certain watercressbeds and certain market-gardens were insufficiently protected against bovine and ovine excreta, and that illicit sales of watercress by non accredited growers were responsible for the contaminations.

The following prophylactic measures are proposed by the authors, according to efficacy :

1. Sanitary protection of watercressbeds against contaminant cattle and their excreta. This is most important and implies :

a) Compulsory establishment of an enclosure (surrounding fences, thorny hedges, wire-nettings).

b) Interdiction of establishing pasturages and stables adjacent to watercress cultures and irrigation sources, of possible connection with them by means of streaming water.

c) Exclusive use of chemical fertilizers and prohibition of animal manures.

2. Suggestive and recreative education of the population, following a practical and non expensive program.

3. Administrative control of watercress cultures and sale.

4. Destruction of parasites in contaminant cattle (bovines, ovines).

5. Destruction of vector molluscs (Limnea).

#### BIBLIOGRAPHIE

[1] LAVIER (G.). *Encyclopédie médico-chirurgicale*, 1950, art. n° 7029.

---

## ESSAIS D'APPRÉCIATION DE LA VALEUR BIOLOGIQUE DES HUMUS

par J. POCHON, M<sup>lle</sup> M.-A. CHALVIGNAC, L. LEBORGNE  
et P. TARDIEUX (\*).

*(Institut Pasteur, Service de Microbiologie du Sol)*

On parvient maintenant, sans difficultés majeures à différencier chimiquement les types d'humus ; on sait cependant qu'à des humus très éloignés dans leurs propriétés correspondent des compositions en acides aminés fort voisines, les nuances portant sur la proportion des divers groupes de ceux-ci [3] ; encore que l'opinion soit loin d'être unanime sur la valeur et la signification des « fractions » que l'on isole des humus et sur leur nomenclature, les notions de  $\alpha$ - et  $\beta$ -humus, d'acides humiques gris ou bruns, d'acides fulvique et hyalomélanique, d'humine, sont extrêmement utiles pour le pédologue.

Mais l'agrobiologiste, lui, est fort mal renseigné sur ce que l'on pourrait appeler la « valeur biologique » d'un humus, c'est-à-dire son activité stimulante ou inhibitrice vis-à-vis de la microflore tellurique et éventuellement sur la végétation. Evidemment, les humus diffèrent entre eux par la constitution et l'activité de leur microflore [6, 14], mais cette analyse microbiologique est trop longue pour être pratique, parfois difficile à interpréter, et, de plus, ne répond que très indirectement à la question posée.

Les épreuves de mesure d'activité biologique globale, quel que soit le principe sur lequel elles sont basées : dégagement de CO<sub>2</sub> (innombrables variantes), calorimétrie [10], fermentation d'un glucide [12], activité d'une enzyme [8], minéralisation de l'azote [5] présentent toutes leur intérêt, surtout pour le pédologue, mais l'interprétation du « chiffre » fourni est, pour le biologiste, pleine de difficultés et même d'embûches.

Dans ce travail nous avons donc cherché à différencier les humus quant à leur valeur biologique, en utilisant un test microbien. Après plusieurs essais c'est finalement le *Rhizobium* que nous avons choisi, pour les raisons suivantes. On sait déjà que, dans le sol sa persistance de survie, après culture de légumineuses,

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 2 mars 1961.

est plus ou moins longue suivant le type pédologique [7] ; on sait aussi que ses besoins nutritionnels sont assez nuancés pour qu'il puisse réagir à un substrat nutritif complexe ; on sait enfin, approximativement, qu'un extrait humique peut, au laboratoire, partiellement remplacer l'extrait de levure dans les milieux usuels pour ces germes.

En effet, en 1936, Allison et Hoover [2] montraient que l'addition d'acide humique naturel à un milieu synthétique stimulait la croissance des *Rhizobium*. A la lumière des travaux plus récents sur la valeur nutritive des acides aminés [43] et les besoins en facteurs de croissance [4, 9], il n'est guère permis d'en tirer une conclusion sur le rôle respectif éventuel de ce type de substances dans l'extrait utilisé. Aucune comparaison entre différents types d'extrait humique n'a été tentée. C'est à partir de ces notions de base que nous avons entrepris notre travail.

### TECHNIQUES.

**PRÉPARATION DES EXTRAITS HUMIQUES.** — Nous avons utilisé la technique de Mayaudon et Simonart [41], dont le principe est le suivant : préextraction hydro-alcoolique, deux fois répétée à 80 p. 100, puis à 20 p. 100, pendant quinze minutes sous réfrigérant à reflux ; extraction humique, sur le culot, par la soude N/10 à 95°, sous azote, pendant quarante-cinq minutes ; lavage du culot par la soude N/10. Après centrifugation, l'extrait humique est clarifié sur célite puis neutralisé par HCl N ; ajustage définitif par  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$  à 1 p. 100. (La teneur en azote total de tels extraits, suivant le type de sol varie entre 0,004 et 0,01 p. 100).

**CULTURE DES *Rhizobium*.** — Nous avons été amenés à choisir des souches telles que leur croissance en milieu minéral + mannitol soit très faible et que, au contraire, celle-ci soit très satisfaisante dans le même milieu additionné d'extrait de levure, c'est-à-dire des souches répondant bien aux facteurs nutritionnels. A ce point de vue les souches de *R. trifolii* se sont montrées beaucoup moins favorables que *R. meliloti*, les premières, en effet, proliférant assez bien sur milieu minéral + mannitol. L'usage nous a montré que les souches choisies par ce critère avaient encore une valeur inégale, surtout du fait de l'instabilité des besoins nutritionnels (sélection, mutations ?) ; deux souches de *R. meliloti* ont été finalement retenues.

Elles étaient cultivées et entretenues sur le milieu de Fred, Baldwin et Mc Coy [7] liquide ou avec gélose :

Chlorure de sodium .....	0,2 g
Phosphate bipotassique .....	0,5 g
Sulfate de magnésium .....	0,2 g
Carbonate de calcium .....	0,1 g
Mannitol .....	10 g
Eau de levure .....	100 ml
Eau .....	900 ml



Avant l'épreuve, les souches sont carencées par passage répété trois fois sur le même milieu où l'eau de levure a été supprimée et où l'azote est fourni sous forme de nitrate d'ammonium 0,1 g/l (quantité d'azote équivalente à celle apportée par l'eau de levure, soit 0,035 g/l).

TEST D'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE. — Le milieu ci-dessus (avec mannitol et nitrate d'ammonium, sans eau de levure) est additionné de 10 p. 100 de l'extrait humique à éprouver et réparti, à raison de 7 ml, dans les cuves à faces parallèles d'un biophotomètre enregistreur (type Bonét-Maury, Jouan) et stérilisé pendant vingt minutes à 115°, puisensemencé avec II gouttes d'une culture sur gélose (formule ci-dessus sans extrait de levure) mise en suspension en eau distillée.

On ensemence simultanément deux témoins : l'un constitué par le milieu sans extrait humique, l'autre par le milieu avec eau de levure (deux répétitions pour chaque milieu). La culture se fait à 28°, avec agitation moyenne, pendant vingt-quatre heures, en enregistrement continu.

On notera que, dans cette technique, l'apport azoté des extraits humiques ne peut entrer en ligne de compte, étant négligeable par rapport à l'azote minéral ajouté ou à l'azote de l'eau de levure.

### RÉSULTATS.

Les extraits ont été préparés à partir des types de sols et des terreaux naturels et artificiels suivants :

	pH
Humus type Mull calcique (Picardie) .....	7,8
Humus type Moder (Vosges) .....	5
Humus type Mor (Vosges) .....	3,5
Humus type tourbeux (Normandie) .....	4,3
Terreau naturel (feuillu) .....	7,2
Terreau naturel (tiges plantes annuelles) ....	6,6
Terreau artificiel (1) (tourbe compostée) .....	6,6
Terreau artificiel (tourbe compostée) .....	6,5
Terreau artificiel (tourbe compostée) .....	6,6

Les résultats sont donnés sous la forme des deux figures d'enregistrement 1 et 2.

La figure 1 met en évidence, par rapport aux témoins (milieu minéral seul, et milieu minéral additionné d'extrait de levure), l'action faiblement stimulante du Mull et l'action inhibitrice du Moder, du Mor et de la tourbe.

La figure 2, par rapport aux mêmes témoins, montre la stimulation assez active des deux terreaux naturels, et celle, plus faible,

(1) Fournis par la Société d'Etudes chimiques pour l'Industrie et l'Agriculture.

des composts de tourbe ; il est intéressant de noter que le compostage a supprimé l'effet inhibiteur de la tourbe et que les trois composts éprouvés n'ont pas la même valeur biologique.

Le but même que nous nous étions proposé étant atteint, puisque

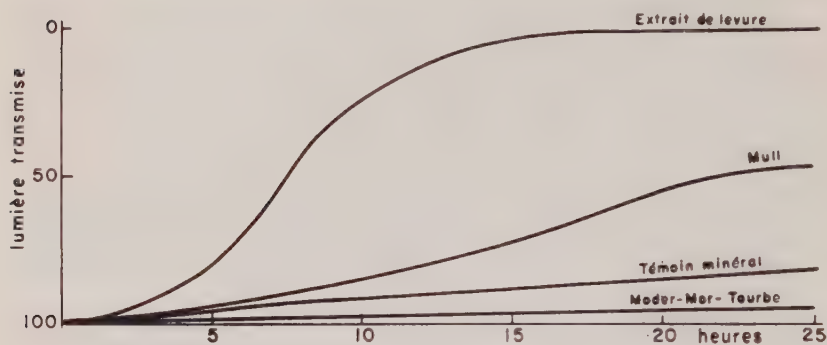


FIG. 1. — Croissance comparée de la souche de *Rhizobium* en présence d'extrait sodique de divers types d'humus et d'extrait de levure-témoin en milieu minéral.

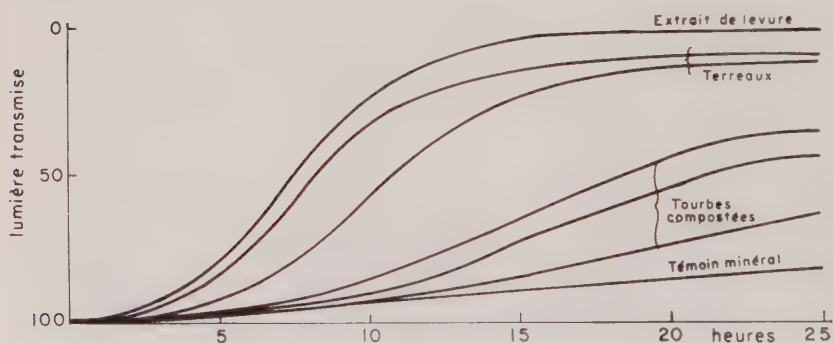


FIG. 2. — Croissance comparée en présence d'extrait sodique de terreaux naturels et artificiels (tourbes compostées à partir de la tourbe inhibitrice de la figure 1). Même témoin.

nous avons un moyen de différencier biologiquement les humus naturels ou artificiels et, en particulier, d'avoir un test commode de mesure de la valeur biologique de ces derniers, il était tentant de rechercher quels pouvaient être les processus responsables de cette activité (positive ou négative) des humus vis-à-vis des *Rhizobium*.

ANALYSE DE LA VALEUR DU TEST. — Dans ce but nous avons préparé, à partir de l'extrait sodique total le plus actif, c'est-à-dire celui de terreau, les diverses fractions correspondant à une des conceptions de la structure des humus, celle de P. Simonart, en utilisant la technique par lui préconisée [41]. C'est ainsi que nous avons obtenu les acides fulviques, l' $\alpha$ - et  $\beta$ -humus, et les acides hymatomélaniques.

Avec toutes ces fractions, ainsi qu'avec l'extraction hydro-alcoolique initiale (le tout préparé à partir du terreau dont la valeur biologique avait été vue maximum), nous avons éprouvé, comme précédemment, l'activité biologique sur le *Rhizobium*.

Nous ne donnerons plus ici les courbes d'enregistrement, mais seulement l'analyse des résultats.

L'extrait hydro-alcoolique est actif, plus même que l'extrait sodique total.

Des différentes fractions de l'extrait sodique, les acides fulviques et le  $\beta$ -humus sont les plus actifs (plus que l'extrait total) ; acides hymatomélaniques et  $\alpha$ -humus sont peu actifs, mais le sont cependant légèrement.

Le fait plus frappant, dans ces résultats, est l'activité maxima de l'extrait hydro-alcoolique ; il devenait ainsi possible de penser que les facteurs de croissance du sol fussent les principaux responsables de la stimulation. Nous avons donc recherché les principaux facteurs de croissance, à savoir : biotine, pyridoxine, acide nicotinique, acide pantothénique, riboflavine, acide folique, thiamine et B<sub>12</sub> dans l'extrait hydro-alcoolique et dans l'extrait humique total du terreau (stimulation élevée du *Rhizobium*) et du Mor (inhibition élevée du *Rhizobium*).

Pour ce faire, nous avons utilisé une méthode biologique et les souches bactériennes tests suivantes (2) : *Arthrobacter* 824, *Micrococcus* 54, *Flavobacterium* S 101 et 785, *Agrobacterium* GR 28 et 94, C. 91, *Arthrobacter duodecalis* 541, *Corynebacterium insidiosum* Ci 3.

Il nous a été possible de caractériser la présence des facteurs de croissance à éprouver au moyen de la méthode de F. D. Cook et A. G. Lochhead [4]. Les résultats sont résumés dans le tableau I.

Il en ressort deux faits importants : tout d'abord, les facteurs de croissance passent en majeure partie dans l'extrait hydro-alcoolique, mais aussi, faiblement, dans l'extrait humique sodique. Ensuite, on en trouve aussi bien dans le Mor (quoique en plus faible quantité) que dans le terreau.

(2) Aimablement fournies par A. G. Lochhead, que nous tenons à remercier ici.

TABLEAU 1. — Facteurs de croissance dans les extraits humiques et hydro-alcooliques de terreau et de Mor.

	TÉMOIN MINÉRAL	TÉMOIN LEVURE	TERREAU		MOR	
			Extrait humique	Extrait hydro-alcoolique	Extrait humique	Extrait hydro-alcoolique
B 12.....	o	++	+	+	+	+
Ac. folique .....	o	++	+	++	o	+
Thiamine .....	o	++	++	++	++	++
Biotine .....	o	++	++	++	+	++
Pyridoxine .....	o	++	o	o	o	o
Ac. nicotinique ...	o	++	++	++	++	+
Ac. pantothénique.	o	++	++	++	o	++
Riboflavine.....	o	++	++	++	++	++

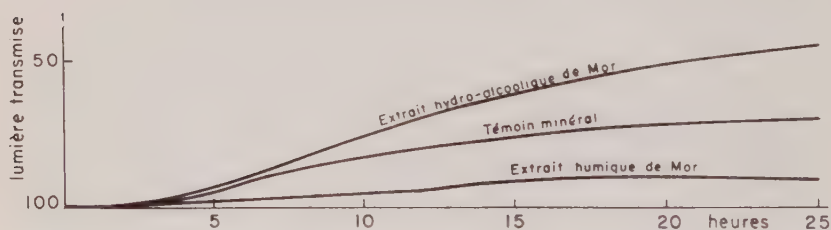


FIG. 3. — Croissance comparée en présence d'extrait hydro-alcoolique et sodique de Mor.

Or, nous savons que, vis-à-vis du *Rhizobium* (c'est-à-dire pour notre épreuve), l'humus de terreau est hautement favorisant, l'autre, celui du Mor, hautement inhibiteur. L'épreuve que nous avons mise au point ne revient donc pas à un simple dosage, vis-à-vis du *Rhizobium* de facteurs de croissance, ce qui lui aurait retiré tout intérêt.

Pour nous en assurer de façon plus démonstrative encore, nous avons recherché sur *Rhizobium* l'activité de l'extrait hydro-alcoolique, d'une part de l'extrait humique, d'autre part du Mor. Les résultats sont traduits dans la figure 3. L'extrait hydro-alcoolique, qui n'a rien à voir avec l'humus et que nous savons maintenant riche en facteurs de croissance, s'y montre stimulant ; l'extrait humique, lui, est, une fois de plus, vérifié inhibiteur... et pourtant, il contient lui aussi des facteurs de croissance.

Il n'est pas dans notre propos de rechercher ici la nature de l'origine des substances responsables de l'effet inhibiteur ; de nombreuses recherches ont été faites sur ce sujet et nos connaissances n'en sont guère qu'à un stade juste suffisant pour montrer la complexité du problème.

Il nous suffisait d'établir la signification, et de tenter de montrer l'intérêt de l'épreuve que nous proposons pour juger de la valeur biologique globale des humus de divers types de sols ainsi que des terreaux naturels et artificiels.

#### CONCLUSION ET RÉSUMÉ.

Pour pallier la difficulté actuelle d'apprécier la valeur biologique d'un humus, c'est-à-dire son action plus ou moins stimulante ou inhibitrice sur la microflore du sol, la mesure de l'activité d'un extrait humique sur la croissance de souches convenablement choisies de *Rhizobium* apparaît comme une épreuve relativement facile à réaliser, dont la signification ne se ramène pas à une simple mise en évidence de facteurs de croissance, et qui permet de hiérarchiser la valeur des humus. Il est permis de penser, tout au moins à titre d'hypothèse de travail, que la hiérarchie ainsi établie serait également valable vis-à-vis des plantes de culture.

Les quelques essais réalisés sur terreaux naturels et artificiels indiquent qu'il y aurait enfin là un moyen de juger de la valeur biologique de ces derniers et de contrôler leur fabrication à ce point de vue.

#### SUMMARY

##### STUDIES ON THE EVALUATION OF THE BIOLOGICAL VALUE OF HUMUS.

It is very difficult to day to estimate the biological value of a humus, i.e. its more or less stimulating action on the soil microflora. The study of the degree of activity of a humus extract on the growth of convenient strains of *Rhizobium* seems to be a test relatively easy to carry out, the significance of which is not only a mere demonstration of growth factors, and which allows to classify the value of different humus lots. One may think, at least as a working hypothesis, that the classification obtained would also be reliable in the case of cultivated plants.

A few experiments carried out on natural and synthetic composts show that this technique might allow to appreciate the biological value of artificial composts and to control their preparation from this view point.

## BIBLIOGRAPHIE.

- [1] ALLEN (E. K.) et ALLEN (O. N.). *Bact. Rev.*, 1950, **4**, 273.
  - [2] ALLISON (F.) et HOOVER. *J. Bact.*, 1936, **31**, 94.
  - [3] CARLES (J.) et DECAU (G.). *Sc. proc. Royal-Dublin Soc. Sér. A.*, 1960, **4**, 177.
  - [4] COOK (F. D.) et LOCHHEAD (A. G.). *Canad. J. Microbiol.*, 1959, **5**, 323.
  - [5] DROUINEAU (G.) et LEFÈVRE (G.). *Ann. Agronom.*, 1949, **9**, 518.
  - [6] DUCHAUFOUR (Ph.) et POCHON (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 261.
  - [7] FRED (E. B.) et coll. *Root nodule bacteria and Leguminous plants*. Madison, Wisc., 1932.
  - [8] HOFMAN (E.) et SEEGERER (A.). *Bioch. Z.*, 1951, **322**, 174.
  - [9] JORDAN (D. C.). *Canad. J. Bact.*, 1952, 30, **425** et 693.
  - [10] LEMEE (G.), LOSSAINT (P.), MATTAUER (H.), WEISSBECKER (R.). *Trav. Inst. Bact.* (Strasbourg, 1958).
  - [11] MAYAUDON (J.) et SIMONART (P.). *Plant and Soil*, 1958, **9**, 376.
  - [12] MOUREAU (Cl.). *Mém. Inst. Sci. Madagascar*, 1957, **8**, 225.
  - [13] NIELSEN (N.). *C. R. Lab. Carlsberg*, 1940, **23**, 115.
  - [14] POCHON (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 352.
-



# L'ANALYSE PARASITAIRE DES SOLS CULTIVÉS

## DÉTECTION DE *FUSARIUM OXYSPORUM* f.sp. *MELONIS*

par C. M. MESSIAEN, H. VENDRAN et C. FAUVEL (\*)

(I. N. R. A., Station de Pathologie végétale du Sud-Est)

### INTRODUCTION.

L'analyse chimique des sols est entrée depuis de nombreuses années dans la pratique agricole. De même, l'analyse de la faune terricole nuisible aux plantes (taupins, nématodes) commence à être réalisée de façon courante. Nous sommes, par contre, moins avancés pour la détection dans le sol des champignons nuisibles aux végétaux cultivés.

Il est cependant des cas où il serait utile de connaître à l'avance le potentiel infectieux d'échantillons de sol, quand ceux-ci proviennent de parcelles destinées à des cultures sensibles à une maladie grave d'origine hypogée.

Un problème précis se pose à nous pour la fusariose du melon. En effet, certains cultivateurs de la région de Carpentras possèdent une population de melons résistant à la fusariose (sinon en totalité du moins en forte proportion [1]). Cette variété a malheureusement un défaut : ses fruits sont plus gros que ceux du Cantaloup charentais (sensible), et la production est moins précoce.

Quand ces cultivateurs projettent une plantation de melons, il est donc très important pour eux de savoir si le sol de leur parcelle est indemne de *Fusarium* (ils pourront alors semer des Charentais), ou si celle-ci est contaminée (dans ce cas, malgré les inconvénients cités plus haut, ils auront avantage à utiliser la variété résistante).

Quels précédents trouvons-nous dans la littérature en ce qui concerne la détection des champignons nuisibles dans le sol ?

Pour les champignons peu fructifères (*Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*), ou croissant trop lentement (*Thielaviopsis*, *Verticillium*), la classique méthode des dilutions est en défaut, les proportions observées dans les boîtes étant très faibles et sans rapport avec la contamination réelle du sol. Les auteurs qui ont

(\*) Manuscrit reçu le 15 février 1961.

(1) Cette variété n'est pas actuellement vendue dans le commerce et reste la stricte propriété de ces cultivateurs.

cherché à estimer le potentiel infectieux ont donc eu recours à des « pièges » : plantules, organes végétaux vivants ou morts. Ces pièges sont placés dans l'échantillon de sol à éprouver et leur contamination est décelée soit par observation directe, soit par isolement.

On a ainsi préconisé l'utilisation de citrons pour déceler *Phytophthora parasitica* et *P. citrophthora* [1, 2], de plantules de haricot ou de tiges de sarrasin stérilisées pour *Rhizoctonia solani* [4], de disques de carotte pour *Thielaviopsis basicola* [4], de plantules de maïs pour *Gibberella zeae* et *Pythium de Baryanum* [9], de plantules de tomate pour *Verticillium albo-atrum* [8].

Les *Fusarium*, par contre, apparaissent en proportion acceptable dans les boîtes de dilution. Snyder [6] signale en particulier l'isolement direct du sol de *F. solani* f. sp. *phaseoli*. Si nous en croyons cependant ses autres travaux, le simple examen microscopique ne saurait nous révéler, en particulier pour *F. oxysporum*, si nous avons affaire à une forme saprophyte ou parasite sur telle ou telle plante [8].

C'est ce qui nous a amenés, dans le cas qui nous préoccupe, à combiner la méthode des dilutions à celle des pièges, pour mettre en évidence *F. oxysporum* f. sp. *melonis* dans les échantillons de sols.

#### MÉTHODE D'ISOLEMENT.

Nadakavukaren et Horner ont signalé la possibilité d'isoler directement du sol *Verticillium albo-atrum*, grâce à l'usage de milieux comprenant uniquement de la gélose, et de l'alcool éthylique à 0,5 p. 100 [3]. Nous n'avons pas réussi à reproduire leurs résultats, mais nous avons constaté, au contraire, que sur les boîtes de gélose-alcool se développaient de nombreux *Fusarium*.

Des essais en tube nous ont montré que, sur un milieu comportant des sels minéraux, du saccharose, de l'extrait de malt et de l'acide citrique, *F. oxysporum* f. sp. *melonis* supportait facilement des concentrations d'alcool de 1 et 2 p. 100. A 3 p. 100 la croissance est réduite, elle devient nulle aux environs de 5 p. 100. Il en est de même pour diverses souches de *F. roseum* et *F. solani*.

Nous avons donc finalement retenu la méthode suivante : on prépare d'une part des tubes contenant 10 cm<sup>3</sup> du milieu gélosé suivant :

pour un litre de solution de Knop :

gélose .....	25 g
saccharose .....	10 g
extrait de malt cristallisé .....	4 g

d'autre part, des tubes contenant 10 cm<sup>3</sup> d'une solution d'acide citrique à 1 g/litre. Tous ces tubes sont stérilisés.



Au moment de l'emploi, on ajoute successivement dans les boîtes :

10 cm<sup>3</sup> de solution citrique,

0,5 cm<sup>3</sup> d'alcool à 95°,

0,5 cm<sup>3</sup> d'une dilution au 1/100 du sol à étudier dans l'eau stérile,

et les 10 cm<sup>3</sup> de milieu gélosé, conservé fluide à 60°, dans un bain-marie thermostatique.

Au bout de quatre jours, les colonies apparues sont observées au microscope, directement sur la boîte, couvercle ouvert.

On peut ainsi constater que l'incorporation d'alcool permet d'augmenter considérablement le pourcentage de *Fusarium* par rapport à la microflore totale. Pour un terrain maraîcher choisi comme exemple, nous avons obtenu les résultats rapportés au tableau I.

TABLEAU I.

	MILIEU SANS ALCOOL (en p. 100)	MILIEU AVEC ALCOOL 2,5 % (en p. 100)
<i>Fusarium</i> .....	5,6	36,0
<i>Aspergillus</i> .....	7,0	21,1
<i>Penicillium</i> .....	4,1	16,7
Divers et non identifiés ..	83,3	26,2

On aboutit donc à une simplification considérable de la microflore où dominant *Fusarium*, *Aspergillus* et *Penicillium*. Parmi les « divers » disparaissent en particulier les genres *Volutella*, *Phoma*, *Stachybotrys*, *Pestalozzia*, *Myrothecium*, *Cladosporium*, *Aureobasidium*.

#### DÉTECTION DE *F. oxysporum* f. sp. *melonis*.

Même si nous comptons à part les *F. oxysporum* parmi les colonies apparues sur les boîtes, seul le repiquage de chacune d'entre elles et des essais de contamination ultérieurs nous renseigneraient sur l'appartenance de ces colonies à telle ou telle race biologique de *F. oxysporum*. Nous avons pensé pouvoir procéder plus vite en opérant de la façon suivante : la gélose des boîtes de Petri correspondant à chaque échantillon est passée au mixer avec de l'eau de façon à obtenir un volume final de 100 cm<sup>3</sup> pour chaque boîte. Des portions de 50 cm<sup>3</sup> de la sus-

pension ainsi obtenue sont répandues à la surface de pots de verre de 500 cm<sup>3</sup>, remplis aux 3/4 de terre stérilisée à la vapeur. On sème dix graines de melon (Cantaloup charentais) par pot, après avoir recouvert avec 2 cm de terre stérilisée, pour éviter le contact direct des graines avec des *Aspergillus*, *Penicillium*, etc., qui pourraient nuire à la germination. Celle-ci a lieu à 100 p. 100 dans tous les cas, et c'est environ douze jours après qu'on voit apparaître les symptômes de fusariose (jaunissement suivi de flétrissement) sur les plantules arrivées au stade deux cotylédons bien épanouis (2). L'expérience est menée à la température de 20°.

#### PREMIERS RÉSULTATS.

Dans un premier essai nous avons mis en comparaison cinq échantillons de terre :

A : prairie de graminées.

B : terrain adjacent, mis en culture depuis trois ans (maïs, tomates, haricots).

C : terreau forestier utilisé à la serre.

D : échantillon prélevé chez un cultivateur de Cavaillon, provenant d'une parcelle où la fusariose du melon a sévi en 1960.

E : terre stérilisée contaminée artificiellement par *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, ayant servi à un essai de résistance variétale.

Nous avons obtenu les résultats rapportés au tableau II.

TABLEAU II.

RÉSULTAT DES ISOLEMENTS	ÉCHANTILLONS				
	A	B	C	D	E
<i>Fusarium</i> .....	32,3	60,0	31,0	65,2	100
<i>Penicillium</i> .....	2,8	0	13	3,5	0
<i>Aspergillus</i> .....	28,8	1,8	5,0	6,5	0
<i>Trichoderma</i> .....	0	0	28,0	0	0
Divers et indéterminés .....	36,1	38,2	23,0	24,8	0
Pourcentage de mortalité dans les pots .....	0	0	0	48	90

(2) On pourrait, au lieu de passer par l'intermédiaire de la boîte de Petri, intercaler une couche de l'échantillon de sol à étudier ; mais cette méthode, plus simple, se montre beaucoup moins sensible. De plus les mortalités peuvent être dues non pas au *Fusarium*, mais à des *Pythium*, *Rhizoctonia*, etc., que la méthode des dilutions élimine.

Dans un deuxième essai nous avons mis en comparaison onze échantillons de sol de diverses provenances (tous prélevés dans le département de Vaucluse).

A : même échantillon que le D du premier essai, conservé sec pendant un mois (terre provenant des environs de Cavaillon, culture maraîchère intensive, où la fusariose du melon a sévi gravement en 1960).

B : échantillon fraîchement prélevé au même endroit que A.

C : échantillon provenant de la même propriété, où la fusariose a sévi moins gravement en 1960 que dans A et B.

D, E : sols de culture maraîchère intensive, des environs de Carpentras où la fusariose du melon a sévi gravement il y a sept ou huit ans. On y cultive depuis des melons résistants.

F : terrain mis en culture maraîchère intensive depuis huit ans, à la suite de l'installation d'un canal d'irrigation, aux environs de Vacqueyras. Apparition de la fusariose du melon en 1960.

G : sol vierge, adjacent à F (chênes verts, thym, lavande, graminées).

H, I : cultures maraîchères extensives de coteau des environs de Goult ; des melons cultivés en 1960 se sont montrés indemnes.

J : terrain voisin de H ; les melons cultivés en 1960, ont été légèrement attaqués.

K : parcelle située près de Flassan, défrichée sur la garrigue en 1958 ; les melons cultivés en 1959 se sont montrés indemnes, le sol est resté nu en 1960.

Cinq boîtes de Petri ont été réalisées par échantillon, et ont été ensuite incorporées à 10 pots à la serre.

De l'examen des résultats (tableau III) nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

I. Les intensités d'attaque observées dans l'expérience sont en relation étroite avec celles qui avaient été constatées au champ en 1960, pour les échantillons B, C, F, H, I, J, K.

II. La culture pendant plusieurs rotations successives de melons résistants ne semble pas faire complètement disparaître le *Fusarium* du sol, bien que le taux d'infestation semble très réduit (échantillons D, E).

III. L'échantillon A, conservé à l'état sec pendant un mois ne voit pas sa virulence diminuée de façon sensible. Le stockage des échantillons à analyser semble donc possible.

IV. Le *Fusarium* ne semble pas préexister en sol vierge (échantillon G).

V. Il ne semble pas exister de relation nette entre la proportion de *Fusarium* spp. ou de *F. oxysporum* dans la microflore des boîtes et le taux d'infestation par *F. oxysporum* f. sp. *melonis*. Si le seul but recherché est la détection de cet organisme, les examens et numérations de colonies semblent donc inutiles.

TABLEAU III.

ÉCHANTILLONS	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
Nombre total de colonies .....	144	103	99	109	46	139	83	73	43	104	49
Pourcentage <i>Fusarium</i> .....	47,2	31,0	30,4	45,0	39,1	30,2	22,8	42,4	27,9	30,7	26,5
Dont pourcentage de <i>F. oxysporum</i> .....	19,4	18,4	17,2	13,8	21,7	7,9	13,2	12,3	4,7	9,6	4,1
Pourcentage <i>Aspergillus</i> .....	15,9	29,1	15,1	22,0	41,3	7,9	46,9	13,7	9,3	18,3	24,5
Pourcentage <i>Penicillium</i> .....	4,2	3,9	19,2	1,8	4,3	17,3	13,3	8,2	20,9	25,0	6,1
Pourcentage Mucorinées .....	9,7	20,4	1,1	0	2,2	0,7	0	1,4	11,6	1,0	2,0
Pourcentage divers et indéterminés .....	22,9	15,6	24,2	31,2	32,6	43,9	16,9	34,2	30,2	25,0	40,1
Pourcentage de mortalité dans les pots .....	46	39	37	4	3	22	0	0	2	1	0

## CONCLUSION.

Nous pensons ainsi avoir mis au point — sous réserve de perfectionnements toujours possibles — une méthode permettant de mettre en évidence *F. oxysporum* f. sp. *melonis* dans des échantillons de sols.

Il est vraisemblable que, moyennant certaines modifications, cette technique pourrait s'appliquer à d'autres *Fusarium* pathogènes. Une simple modification de la température d'incubation (qui devrait être portée à 28-30°) permettrait sans doute de déceler *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, redouté sur tout le périmètre méridional de la Méditerranée (Israël, Afrique du Nord, Campanie, Sicile, Grèce) : dans des régions plus méridionales encore, on pourrait penser à la détection de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* du cotonnier.

## SUMMARY

## PARASITOLOGICAL ANALYSIS OF CULTIVATED SOILS.

QUANTITATIVE DETERMINATION OF *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*

It seems worth while for the grower to know whether the field on which he wants to grow muskmelons is invaded by *F. oxysporum* f. sp. *melonis* or not. A method for quantitative determination of this fungus in soil samples is described.

Soil dilution plates are prepared with a medium containing mineral salts, saccharose, citric acid, malt extract and 2,5 % ethyl alcohol. The presence of alcohol allows selective isolation of *Fusarium* spp. The Petri dishes are incubated four days, the agar is then homogenized in a mechanical mixer with water. The suspension so obtained is poured into pots of sterilized soil, on which muskmelon seeds are sown. Twelve to fifteen days later the proportion of diseased seedlings gives an evaluation of the inoculum potential of the soil sample.

This method is much more sensitive than direct sowing in suspected soil samples, and the possible confusion between *Fusarium*, and *Rhizoctonia* or *Pythium* mortality is avoided.

## BIBLIOGRAPHIE.

- [1] KLOTZ (L. J.). *Pl. Dis. Rep.*, 1958, **42**, 675.
  - [2] MESSIAEN (C. M.). *C. R. Acad. Agric. France*, 1957, **43**, 384.
  - [3] NADAKAVUKAREN (M. J.) et HORNER (C. E.). *Phytopathology*, 1959, **49**, 527.
  - [4] PAPAIVISAS (G. C.) et DAVEY (C. B.). *Pl. Dis. Rep.*, 1959, **43**, 404.
  - [5] SNYDER (W. C.) et HANSEN (H. N.). *Amer. J. Botany*, 1940, **64**, 67.
  - [6] SNYDER (W. C.), NASH (S. M.) et TRUGILLO (E.). *Phytopathology*, 1959, **49**, 310.
  - [7] TSAO (P. H.). *Phytopathology*, 1958, **48**, 398.
  - [8] WILHELM (S.). *Phytopathology*, 1950, **40**, 368.
  - [9] YARWOOD (C. E.). *Mycologia*, 1946, **38**, 346.
-



# **TENEUR DES SOUCHES SAUVAGES DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS EN VARIANTS RÉSISTANTS A L'ISONIAZIDE ET EN VARIANTS RÉSISTANTS A LA STREPTOMYCINE SUR MILIEU DE LOEWENSTEIN-JENSEN**

par G. CANETTI et J. GROSSET (\*).

(Institut Pasteur, Service de la Tuberculose)

Les études sur la teneur des souches sauvages de bacilles tuberculeux en variants (1) résistants remontent presque toutes aux premiers temps de la chimiothérapie [5, 9, 10, 11, 12, 14, 15]. Elles portent en général sur un petit nombre de souches, et certaines d'entre elles n'indiquent le taux de variants résistants que pour un ou deux niveaux de résistance. Enfin, ces études utilisent rarement le milieu de Loewenstein-Jensen, qui est devenu le milieu de choix pour les mesures de résistance du bacille tuberculeux. Or, les taux de variants résistants dans une souche donnée varient notablement selon le milieu de culture, ce qui tient à l'inactivation très inégale des agents antibacillaires selon les milieux. A bien des égards, des études complémentaires sont donc nécessaires en ce domaine.

Une connaissance exacte de la structure des souches sauvages importe pour plusieurs raisons. La plus importante, d'un point de vue pratique, est la fixation de *critères exacts* pour la définition de l'isoniazido-résistance et de la streptomycino-résistance, domaine où règne actuellement un désordre grave. Mais l'intérêt théorique d'études approfondies en cette matière est non moins grand. L'examen des modalités d'apparition des colonies résis-

(\*) Manuscrit reçu le 20 mars 1961.

(1) Le terme de *variants* a été systématiquement employé au cours de ce travail pour ne point préjuger de l'exacte nature des bacilles qui se multiplient sur les milieux avec antibiotiques. Selon toute vraisemblance il s'agit essentiellement de *mutants* résistants. Toutefois, les bacilles qui se multiplient sur les concentrations d'antibiotiques proches de la concentration minima active peuvent également être d'une autre nature.

tantes des souches sauvages attire l'attention sur l'extrême complexité des facteurs qui interviennent dans le développement des populations résistantes, et plus particulièrement sur les facteurs, nombreux et enchevêtrés, qui règlent le niveau de résistance atteint. A cet égard, le bacille tuberculeux, fort délaissé jusqu'ici, offre aux généticiens un champ d'études prometteur, encore que d'une approche assez difficile. Cet aspect théorique du problème ne sera que brièvement évoqué dans le présent travail.

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES.

La détermination du taux des variants résistants à l'isoniazide ou à la streptomycine a été faite pour 22 souches de *Mycobacterium tuberculosis*.

*Origine et isolement des souches.* — Les souches étudiées proviennent toutes de malades entrés au Centre Edouard-Rist du Sanatorium des Etudiants de France pour tuberculose pulmonaire, et non encore traités par les agents antibacillaires. L'enquête excluant toute chimiothérapie antérieure a été menée avec soin ; les cas douteux ont été éliminés. L'isolement de la souche à partir de l'expectoration a été faite sur milieu de Loewenstein-Jensen par la technique habituelle à la soude. Seuls les cas ayant fourni une culture abondante (plus de 50 colonies par tube) ont été utilisés. Ces cultures avaient toutes l'aspect eugonique et légèrement pigmenté des cultures de bacilles humains.

Le milieu de culture employé pour la détermination des variants résistants a été le milieu de Loewenstein-Jensen (tubes de 17 mm de diamètre, contenant 7 ml de milieu), auquel l'isoniazide ou la streptomycine étaient ajoutés *avant coagulation*. Les concentrations d'isoniazide ajoutées ont été, par millilitre de milieu : 0,05  $\mu\text{g}$ , 0,1  $\mu\text{g}$ , 0,2  $\mu\text{g}$ , 0,5  $\mu\text{g}$ , 1  $\mu\text{g}$ , 5  $\mu\text{g}$  et 25  $\mu\text{g}$ . Dans quelques cas, les concentrations de 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  et 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ont été également étudiées ; par contre, certaines des concentrations indiquées ci-dessus ont été parfois omises. Pour l'étude des variants résistants à la streptomycine, c'est de la *dihydrostreptomycine* qui a été ajoutée au milieu avant coagulation, aux concentrations suivantes, par ml de milieu : 2  $\mu\text{g}$ , 4  $\mu\text{g}$ , 10  $\mu\text{g}$ , 20  $\mu\text{g}$ , 200  $\mu\text{g}$  et 2 000  $\mu\text{g}$ . Dans quelques cas, la concentration de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  a également été employée. La dihydrostreptomycine a été choisie de préférence à la streptomycine, parce que l'incidence des facteurs qui diminuent la concentration d'antibiotique réellement active dans le milieu est beaucoup plus grande pour la streptomycine que pour la dihydrostreptomycine. Ce fait est longuement précisé ailleurs (Grosset et Canetti [8]). Les milieux ont été coagulés à 85° C pendant cinquante à soixante minutes.

*Semence.* — Les primo-cultures des souches ont été réensemencées en milieu de Dubos liquide au Tween. Deux à trois passages dans ce milieu ont été faits, jusqu'à obtention de cultures parfaitement homogènes. A partir de ces cultures, âgées de 7 à 10 jours, des dilutions successives au 1/10, allant jusqu'à 10<sup>-5</sup> ou 10<sup>-6</sup>, parfois 10<sup>-7</sup>, ont été pré-

parées en eau distillée. Sur les milieux avec drogue, seules les dilutions allant jusqu'à  $10^{-2}$  ont été ensemencées (jusqu'à  $10^{-3}$  ou  $10^{-4}$ , pour les tubes contenant 0,05  $\mu\text{g/ml}$  d'isoniazide et ceux contenant 2  $\mu\text{g/ml}$  ou 1  $\mu\text{g/ml}$  de streptomycine). Sur les milieux-témoin, destinés à renseigner sur le nombre d'unités bacillaires viables présentes dans la semence, les dilutions plus faibles ont également été ensemencées, à raison de 0,2 ml par tube. Le nombre de tubes employés par concentration de drogue et par dilution de bacilles a été le plus souvent de trois, parfois de deux.

*Lecture des résultats.* — La lecture des résultats a été faite à deux reprises, aux environs du vingt-cinquième jour et aux environs du quarantième. Les colonies présentes dans les tubes ayant reçu la plus faible dilution positive ont été comptées ; ce compte a servi de base pour le calcul du taux des variants résistants. Dans quelques cas, les colonies fournies par la dilution immédiatement supérieure ont également pu être comptées (moins de 100 colonies par tube) : dans ce cas, le calcul a été basé sur les deux comptes. Pour quelques souches, le nombre minimum de colonies obtenu sur les tubes contenant 0,05  $\mu\text{g/ml}$  d'isoniazide ou 2  $\mu\text{g/ml}$  de streptomycine avec la plus faible dilution ensemencée n'a pu être qu'estimé. Les colonies de très faible volume, se trouvant parfois à la limite de la visibilité, ont été incluses dans les comptes.

### RÉSULTATS.

Les résultats sont consignés dans les tableaux I pour l'isoniazide et II pour la streptomycine. Ces tableaux indiquent pour chaque souche, aux deux dates de lecture, les taux des variants résistants aux diverses concentrations d'antibiotique, taux rapportés toujours à  $10^6$  bacilles. Le taux *moyen* (moyenne des taux pour l'ensemble des souches) figure au bas des tableaux. Pour les concentrations 0,05  $\mu\text{g/ml}$  d'isoniazide et 2  $\mu\text{g/ml}$  de streptomycine, pour lesquelles les taux montrent des écarts considérables d'une souche à l'autre, c'est le taux *médian* qui est indiqué. Le nombre de bacilles viables ensemencés pour chaque souche est également porté sur les tableaux.

#### A. — Variants résistants à l'isoniazide.

a) *Taux aux différentes concentrations d'isoniazide.* — Il y a lieu de considérer d'abord les résultats observés au quarantième jour ; ce sont les résultats définitifs.

Pour la concentration de 0,05  $\mu\text{g/ml}$  d'isoniazide, le taux de variants résistants, exprimé sur  $10^6$  bacilles, est extrêmement variable d'une souche à l'autre. Il va de 39 (souche 332) à 40 000 (souche 401) ; dans plus de la moitié des cas, il est supérieur à 1 000 ; dans un quart des cas, il est supérieur à 10 000. Le taux médian est de 1 000.



Pour la concentration de  $0,1 \mu\text{g/ml}$  d'isoniazide, le taux des variants est presque toujours inférieur à 100 ; il se situe cinq fois entre 1 et 10, quinze fois entre 10 et 100 ; deux fois seulement, il dépasse très légèrement 100 (souches 365 et 415). Le taux moyen est de 41.

Pour la concentration de  $0,2 \mu\text{g/ml}$ , le taux des variants se situe presque toujours entre 1 et 10 ; il n'est supérieur à 10 qu'une fois (souche 8) ; le taux moyen est ici de 5.

A partir de la concentration de  $0,5 \mu\text{g/ml}$ , la décroissance des taux est très lente. Pour les concentrations de  $0,5 \mu\text{g/ml}$  et de  $1 \mu\text{g/ml}$  d'isoniazide, les taux moyens sont respectivement de 4,2 et 3,3 ; pour les concentrations de  $5 \mu\text{g/ml}$  et  $25 \mu\text{g/ml}$ , ils se situent autour de 1,5. La présence de variants résistants à  $100 \mu\text{g/ml}$  est très exceptionnelle, tout au moins avec les souches employées dans ce travail.

Les résultats au *vingt-cinquième jour* se distinguent de ceux du quarantième jour par deux caractères : des taux de variants résistants moins élevés, et un volume bien moindre des colonies sur le milieu avec drogue. Le premier caractère est dû au fait que le nombre de colonies sur les tubes témoins, c'est-à-dire le nombre de bacilles viables sur lequel le taux des variants résistants est calculé, ne change guère entre le vingt-cinquième et le quarantième jour, alors que le nombre de colonies dans les tubes avec drogue s'accroît nettement pendant cette période : les taux des variants calculés s'en accroissent d'autant. Ce fait traduit la *dysgonie* de la plus grande partie des variants résistants des souches sauvages sur les milieux avec drogue ; il est d'une grande importance théorique. L'accroissement des taux entre le vingt-cinquième et le quarantième jour est variable d'une souche à l'autre ; si l'on considère les taux *moyens*, l'accroissement est de l'ordre de 1 à 2, ou 1 à 3, sauf pour les taux de  $0,05 \mu\text{g/ml}$ , où il est supérieur. Il ne diffère pas sensiblement d'une concentration d'isoniazide à l'autre : ce fait, on le verra plus loin, importe pour l'interprétation de la nature des colonies apparaissant tardivement sur les milieux avec drogue.

L'autre caractère par lequel les résultats du vingt-cinquième jour se distinguent de ceux du quarantième jour est le volume bien moindre des colonies sur les milieux avec drogue. Ce fait traduit lui aussi la *dysgonie* des variants résistants sur ces milieux. Au vingt-cinquième jour, beaucoup de colonies y sont à la limite de la visibilité. Leur accroissement ultérieur est variable : même au quarantième jour, certaines colonies restent exiguës ; d'autres, devenues plus grandes, sont encore inférieures aux colonies des tubes témoins. Ce caractère n'est pas étroitement parallèle aux concentrations d'isoniazide des milieux, mais il tend à être plus prononcé dans les milieux à concentration forte.

TABLEAU I. — Teneur des souches sauvages de *Mycobacterium tuberculosis* en variants résistants à l'isoniazide.  
(Nombre de variants résistants sur  $10^6$  bacilles. Milieu de Loewenstein-Jensen.)

SOUCHÉ	SEMENCE (1)	JOUR	CONCENTRATION D'ISONIAZIDE (2)								
			0,05	0,1	0,2	0,5	1	2	5	25	100
I	$2 \times 10^6$	$\left\{ \begin{array}{l} 25^e \dots\dots \\ 40^e \dots\dots \end{array} \right.$	40 90	6 29	0 1	0 1	0 0		0 0	0 0	
2	$50 \times 10^6$	$\left\{ \begin{array}{l} 25^e \dots\dots \\ 40^e \dots\dots \end{array} \right.$	300 500	3 13	0,2 3	? 4	? 2		? 1	0 0,5	0 0
3	$9 \times 10^6$	$\left\{ \begin{array}{l} 25^e \dots\dots \\ 40^e \dots\dots \end{array} \right.$	10 000 19 000	4 32	0,5 5	0,3 2	0,4 1		0 0,3	0 0,1	0 0
5	$10 \times 10^6$	$\left\{ \begin{array}{l} 25^e (3) \dots\dots \\ 40^e \dots\dots \end{array} \right.$	200	5	3	2	2		2	0,1	0
8	$1 \times 10^6$	$\left\{ \begin{array}{l} 25^e \dots\dots \\ 40^e \dots\dots \end{array} \right.$	900 2 200	41 56	7 41	2 28	0 11		0 4	0 2	0 0
12	$15 \times 10^6$	$\left\{ \begin{array}{l} 25^e \dots\dots \\ 40^e \dots\dots \end{array} \right.$	80 700	6 70	6 6	6 6	1 6		0,7 4	1 4	0 1
16	$2 \times 10^6$	$\left\{ \begin{array}{l} 25^e \dots\dots \\ 40^e \dots\dots \end{array} \right.$	60 170	1 32	0 1	0 0	0 0		0 0	0 0	0 0
III	$3 \times 10^6$	$\left\{ \begin{array}{l} 25^e \dots\dots \\ 40^e \dots\dots \end{array} \right.$	? 1 000	14 80		0	8 8		6 7	4 4	
II4	$1 \times 10^6$	$\left\{ \begin{array}{l} 25^e \dots\dots \\ 40^e \dots\dots \end{array} \right.$	1 100 13 000	16 38			4 8		0 2	0 0	
323	$2 \times 10^6$	$\left\{ \begin{array}{l} 25^e \dots\dots \\ 40^e \dots\dots \end{array} \right.$	83 11 000	35 80			8 12		0,1 0,1	0,1 0,1	
332	$7 \times 10^6$	$\left\{ \begin{array}{l} 25^e \dots\dots \\ 40^e \dots\dots \end{array} \right.$	3 39	4 6			0 2		0 0	0,6 0,3	

(1) Nombre de bacilles viables ensemencés par concentration d'isoniazide.

(2) En  $\mu\text{g/ml}$  de milieu de Loewenstein-Jensen (incorporation avant coagulation).

(3) Lecture non faite à cette date.

(4) Teneur médiane. — L'absence de chiffre indique que la concentration correspondante n'a pas été étudiée.

TABLEAU I (Suite).

SOUCHE	SEMENCE (1)	JOUR	CONCENTRATION D'ISONIAZIDE (2)								
			0,05	0,1	0,2	0,5	1	2	5	25	100
365	1 × 10 <sup>6</sup>	{ 25 <sup>e</sup> ..... 40 <sup>e</sup> .....	? 1 600	37 110			1 4		1 4	11 14	
395	11 × 10 <sup>6</sup>	{ 25 <sup>e</sup> (3).. 40 <sup>e</sup> .....	14 000	38	9		7		5	3	1
401	14 × 10 <sup>6</sup>	{ 25 <sup>e</sup> ..... 40 <sup>e</sup> .....	25 000 40 000	9 16	2 3	2 3	2 2	1	0,1 0,3	0,1 0,3	0 0
402	7 × 10 <sup>6</sup>	{ 25 <sup>e</sup> ..... 40 <sup>e</sup> .....	22 66	3 5	0,2 2	0,3 4	0 0,6	0,1 0,7	0,1 0,3	0 0	0 0
404	14 × 10 <sup>6</sup>	{ 25 <sup>e</sup> ..... 40 <sup>e</sup> .....	32 53	5 11	1 2	3 3	3 3	2 2	0,3 0,4	0,2 0,2	
405	12 × 10 <sup>6</sup>	{ 25 <sup>e</sup> ..... 40 <sup>e</sup> .....		3 5	2 2	3 3	1 1	1 1	1 1	1 1	
406	5 × 10 <sup>6</sup>	{ 25 <sup>e</sup> ..... 40 <sup>e</sup> .....		16 18	2 2	1 1	0,2 0,2	0,2 0,2	0,2 0,2	0 0	
414	12 × 10 <sup>6</sup>	{ 25 <sup>e</sup> ..... 40 <sup>e</sup> .....	34 56	2 2	0,5 1	0,2 0,5	0,2 0,4	0,1 0,2	0,1 0,4	<0,1 <0,1	
415	4 × 10 <sup>6</sup>	{ 25 <sup>e</sup> ..... 40 <sup>e</sup> .....	7 000 8 000	75 180	0 0,5	0 0	0,5 0,5	0 0	0 0	0 0	
416	58 × 10 <sup>6</sup>	{ 25 <sup>e</sup> ..... 40 <sup>e</sup> .....	1 100 3 400	4 50	0 0,5	0,3 0,5	0 0,2	0,1 0,3	0 0	0,1 0,1	
H 37 Rv	14 × 10 <sup>6</sup>	{ 25 <sup>e</sup> ..... 40 <sup>e</sup> .....		7 10	5 5	4 4	1 1	1 1	0,1 0,5	0 1	
Teneur moyenne		{ 25 <sup>e</sup> ..... 40 <sup>e</sup> .....	83 (4) 1 000 (4)	15 41	1,6 5	1,6 4,2	1,6 3,3		0,5 1,5	0,9 1,4	

TABLEAU II. — Teneur des souches sauvages de *Mycobacterium tuberculosis* en variants résistants à la streptomycine. (Nombre de variants résistants sur  $10^6$  bacilles. Milieu de Loewenstein-Jensen).

SOUCHÉ	SEMENCE (1)	JOUR	CONCENTRATION DE DIHYDROSTREPTOMYCINE (2)						
			1	2	4	10	20	200	2 000
2	$50 \times 10^6$	$\left. \begin{array}{l} 25^\circ \dots\dots\dots \\ 40^\circ \dots\dots\dots \end{array} \right\}$		$\begin{array}{l} ? \\ > 20\ 000 \end{array}$	$\begin{array}{l} 2 \\ 8 \end{array}$	$\begin{array}{l} 0,3 \\ 3 \end{array}$	$\begin{array}{l} 0,1 \\ 1 \end{array}$	$\begin{array}{l} < 0,1 \\ 0,1 \end{array}$	$\begin{array}{l} < 0,1 \\ 0,1 \end{array}$
3	$9 \times 10^6$	$\left. \begin{array}{l} 25^\circ \dots\dots\dots \\ 40^\circ \dots\dots\dots \end{array} \right\}$		$\begin{array}{l} 190 \\ 3\ 800 \end{array}$	$\begin{array}{l} 10 \\ 13 \end{array}$	$\begin{array}{l} 8 \\ 8 \end{array}$	$\begin{array}{l} 3 \\ 3 \end{array}$	$\begin{array}{l} 0 \\ 1 \end{array}$	$\begin{array}{l} 0 \\ 0 \end{array}$
5	$10 \times 10^6$	$\left. \begin{array}{l} 25^\circ (3) \dots\dots\dots \\ 40^\circ \dots\dots\dots \end{array} \right\}$		$\begin{array}{l} 12\ 000 \end{array}$	30	2	0,3	0,1	0
12	$15 \times 10^6$	$\left. \begin{array}{l} 25^\circ \dots\dots\dots \\ 40^\circ \dots\dots\dots \end{array} \right\}$		$\begin{array}{l} 20 \\ 3\ 000 \end{array}$	$\begin{array}{l} 3 \\ 4 \end{array}$	$\begin{array}{l} 0,3 \\ 1 \end{array}$	$\begin{array}{l} 0 \\ 0,1 \end{array}$	$\begin{array}{l} 0 \\ 0 \end{array}$	$\begin{array}{l} 0 \\ 0 \end{array}$
13	$11 \times 10^6$	$\left. \begin{array}{l} 25^\circ \dots\dots\dots \\ 40^\circ \dots\dots\dots \end{array} \right\}$		$\begin{array}{l} 5\ 000 \\ 5\ 000 \end{array}$	$\begin{array}{l} 15 \\ 400 \end{array}$	$\begin{array}{l} 0,1 \\ 3 \end{array}$	$\begin{array}{l} 0 \\ 2 \end{array}$	$\begin{array}{l} 0 \\ 0 \end{array}$	$\begin{array}{l} 0 \\ 0 \end{array}$
17	$7 \times 10^6$	$\left. \begin{array}{l} 25^\circ \dots\dots\dots \\ 40^\circ \dots\dots\dots \end{array} \right\}$		$\begin{array}{l} 10\ 000 \\ 10\ 000 \end{array}$	$\begin{array}{l} 5 \\ 80 \end{array}$	$\begin{array}{l} 0,5 \\ 3 \end{array}$	$\begin{array}{l} 0,1 \\ 6 \end{array}$	$\begin{array}{l} 0,1 \\ 0,1 \end{array}$	$\begin{array}{l} 0 \\ 0 \end{array}$
III	$3 \times 10^6$	$\left. \begin{array}{l} 25^\circ \dots\dots\dots \\ 40^\circ \dots\dots\dots \end{array} \right\}$		$\begin{array}{l} 100\ 000 \\ 100\ 000 \end{array}$	$\begin{array}{l} 80 \\ 80 \end{array}$	$\begin{array}{l} 3 \\ 12 \end{array}$	$\begin{array}{l} 0 \\ 8 \end{array}$	$\begin{array}{l} 0 \\ 0 \end{array}$	$\begin{array}{l} 0 \\ 0 \end{array}$
395	$11 \times 10^6$	$\left. \begin{array}{l} 25^\circ (3) \dots\dots\dots \\ 40^\circ \dots\dots\dots \end{array} \right\}$		$\begin{array}{l} 1\ 800 \\ ? \end{array}$	$\begin{array}{l} 9 \\ 2 \end{array}$	$\begin{array}{l} 2 \\ 1 \end{array}$	$\begin{array}{l} 0,6 \\ 0 \end{array}$	$\begin{array}{l} 0,1 \\ 0 \end{array}$	$\begin{array}{l} 0 \\ 0 \end{array}$
401	$14 \times 10^6$	$\left. \begin{array}{l} 25^\circ \dots\dots\dots \\ 40^\circ \dots\dots\dots \end{array} \right\}$		$\begin{array}{l} 40\ 000 \\ ? \end{array}$	$\begin{array}{l} 2 \\ 0,3 \end{array}$	$\begin{array}{l} 1 \\ 0,3 \end{array}$	$\begin{array}{l} 0 \\ 0 \end{array}$	$\begin{array}{l} 0 \\ 0,1 \end{array}$	$\begin{array}{l} < 0,1 \\ 0 \end{array}$
402	$7 \times 10^6$	$\left. \begin{array}{l} 25^\circ \dots\dots\dots \\ 40^\circ \dots\dots\dots \end{array} \right\}$		$\begin{array}{l} 3\ 000 \\ 9 \end{array}$	$\begin{array}{l} 3 \\ 1 \end{array}$	$\begin{array}{l} 0,3 \\ 0,1 \end{array}$	$\begin{array}{l} 0 \\ 0 \end{array}$	$\begin{array}{l} 0,1 \\ 0 \end{array}$	$\begin{array}{l} 0 \\ 0 \end{array}$
404	$15 \times 10^6$	$\left. \begin{array}{l} 25^\circ \dots\dots\dots \\ 40^\circ \dots\dots\dots \end{array} \right\}$		$\begin{array}{l} 500 \end{array}$	5	0,6	0	0	0

(1) Nombre de bacilles viables ensemencés par concentration de dihydrostreptomycine.

(2) En  $\mu\text{g/ml}$  de milieu de Loewenstein-Jensen (incorporation avant coagulation).

(3) Lecture non faite à cette date.

(4) Teneur médiane. — L'absence de chiffre indique que la concentration correspondante n'a pas été étudiée.

TABLEAU II (Suite).

SOUCHE	SEMENCE (i)	JOUR	CONCENTRATION DE DIHYDROSTREPTOMYCINE							
			I	2	4	10	20	200	2000	
405	12 × 10 <sup>6</sup>	{ 25 <sup>e</sup> ..... 40 <sup>e</sup> .....		70 000 90 000	25 50	0,4 0,7	0 0	0 0	0 0	
406	5 × 10 <sup>6</sup>	{ 25 <sup>e</sup> ..... 40 <sup>e</sup> .....		25 000 60 000	40 60	0,4 1	0,2 0,2	0 0	0 0	
407	5 × 10 <sup>6</sup>	{ 25 <sup>e</sup> ..... 40 <sup>e</sup> .....	1 250 15 000	3 670	0,2 0,7	0 0	0 0	0 0	0 0	
410	170 × 10 <sup>6</sup>	{ 25 <sup>e</sup> ..... 40 <sup>e</sup> .....	120 000 200 000	6 240	2 2	1 1	< 0,1 < 0,1	< 0,1 < 0,1		
411	9 × 10 <sup>6</sup>	{ 25 <sup>e</sup> ..... 40 <sup>e</sup> .....	6 000 50 000	4 100	3 4	0,2 0,2	0,3 0,4	0,4 0,4		
412	38 × 10 <sup>6</sup>	{ 25 <sup>e</sup> ..... 40 <sup>e</sup> .....	500 000 600 000	10 000 40 000	2 10	0,1 0,2	0 < 0,1	0 0		
413	22 × 10 <sup>6</sup>	{ 25 <sup>e</sup> ..... 40 <sup>e</sup> .....	125 000 330 000	140 1 700	3 48	0 0,6	0,1 0,1	< 0,1 < 0,1		
414	12 × 10 <sup>6</sup>	{ 25 <sup>e</sup> ..... 40 <sup>e</sup> .....	200 000 200 000	400 10 000	9 28	1 2				
415	4 × 10 <sup>6</sup>	{ 25 <sup>e</sup> ..... 40 <sup>e</sup> .....	11 000 300 000	450 6 000	3 15	0,2 1				
416	58 × 10 <sup>6</sup>	{ 25 <sup>e</sup> ..... 40 <sup>e</sup> (3).....	> 100 000 10 000 25 000	300 80 200	10 0,2 2	0 0 0	0	0	0	
H 37 Rv	14 × 10 <sup>6</sup>	{ 25 <sup>e</sup> ..... 40 <sup>e</sup> .....		300 (4) 5 000 (4)	10,7 41	0,8 2	(0,9) (0,9)	< 0,1 ( 0,1)	< 0,01 < 0,02	
Teneur moyenne		{ 25 <sup>e</sup> ..... 40 <sup>e</sup> .....								



b) *Rapports des taux entre eux : profil de la résistance.* — Il y a lieu d'examiner les rapports que les taux des variants résistants aux différentes concentrations d'isoniazide affectent entre eux : considérés dans leur ensemble, ces rapports réalisent le *profil* de la résistance d'une souche. Les *taux moyens* au quarantième jour montrent entre eux les rapports suivants. Entre le taux de variants noté à  $0,05 \mu\text{g/ml}$  et celui noté à  $0,1 \mu\text{g/ml}$ , le rapport est de l'ordre de 25 à 1. Entre les taux notés à  $0,1$  et  $0,2 \mu\text{g/ml}$ , le rapport est de l'ordre de 10 à 1. Entre les taux notés à  $0,2 \mu\text{g/ml}$  et  $1 \mu\text{g/ml}$ , il y a quasi-identité. Il en est de même entre les taux à 5 et à  $25 \mu\text{g/ml}$ . Enfin, entre les taux à  $1 \mu\text{g/ml}$  d'une part, et 5 à  $25 \mu\text{g/ml}$  d'autre part, le rapport est de l'ordre de 3 à 1 ou 2 à 1. De ces constatations, on déduit que l'immense majorité (environ 95 p. 100) des variants qui se multiplient sur  $0,05 \mu\text{g/ml}$  ont une limite supérieure de résistance qui se situe au-dessous de  $0,2 \mu\text{g/ml}$ . A partir de cette concentration, les choses changent. La majorité des variants résistants à  $0,2 \mu\text{g/ml}$  ont en fait une limite supérieure de résistance considérablement plus élevée, dépassant  $1 \mu\text{g/ml}$ . Une proportion notable d'entre eux, environ 20 p. 100, ont même une résistance dépassant  $25 \mu\text{g/ml}$ .

Mais il ne s'agit là que de moyennes : on observe des différences considérables d'une souche à l'autre. Les variations les plus intéressantes sont celles qui concernent les rapports entre les taux des variants à  $0,1 \mu\text{g/ml}$  et à  $0,2 \mu\text{g/ml}$ , ainsi que celles qui concernent les concentrations supérieures. Il existe des souches dans lesquelles les taux des variants à  $0,1 \mu\text{g/ml}$  et à  $0,2 \mu\text{g/ml}$  sont presque identiques (souches 5, 8, 405) ; à l'inverse, il en existe où l'écart entre les deux taux est considérable, atteignant le centuple (souches 16, 415, 416). De même, la décroissance entre le taux des variants à  $0,2 \mu\text{g/ml}$  et celui à  $25 \mu\text{g/ml}$  est parfois négligeable (souche 405) ; dans d'autres cas, la décroissance est fort importante (souche 8). Ces variations, jointes à celles qui existent pour les taux des variants aux concentrations intermédiaires d'isoniazide, confèrent à chaque souche un *profil* de résistance particulier. Ce profil ne vaut toutefois que pour le moment où la mesure est faite ; la question de savoir s'il représente pour chaque souche une sorte de constante sera évoquée plus loin.

#### B. — Variants résistants à la streptomycine.

a) *Taux aux différentes concentrations de streptomycine.* — *Résultats au quarantième jour.* Pour la concentration de  $2 \mu\text{g/ml}$ , le taux des variants est extrêmement variable d'une souche à l'autre ; il va de 100 (souche 411) à 100 000 (souche 111) ; dans les trois quarts des cas, il est supérieur à 1 000 ; dans près de la moitié des cas, il est supérieur à 10 000. Le taux médian est ici

au minimum de l'ordre de 5 000. (La concentration de 1  $\mu\text{g/ml}$  n'a été étudiée que pour 7 souches ; presque toujours, le taux de bacilles ayant poussé sur cette concentration a dépassé 100 000).

Pour la concentration de 4  $\mu\text{g/ml}$ , le taux des variants se situe presque toujours entre 1 et 100 ; douze fois il est compris entre 1 et 10, huit fois entre 10 et 100 ; une seule fois il dépasse 100 (souche 13). Le taux moyen est ici de 41.

A la concentration de 10  $\mu\text{g/ml}$ , le taux des variants est presque toujours inférieur à 10 ; huit fois, il est inférieur à 1, et treize fois, compris entre 1 et 10. Le taux moyen est de 2.

Sur 20  $\mu\text{g/ml}$  de streptomycine, le taux moyen des variants n'est plus que de 0,9. Sur 200  $\mu\text{g/ml}$ , la plupart des souches ne montrent pas de variants résistants avec les semences employées. Sur 2 000  $\mu\text{g/ml}$ , la présence de pareils variants est tout à fait exceptionnelle.

La différence entre ces résultats et ceux observés au vingt-cinquième jour est la même que pour l'isoniazide : au vingt-cinquième jour, les taux de variants résistants sont moins élevés, et le volume des colonies sur les milieux avec drogue est moindre. Ici encore, c'est la dysgonie de la grande majorité des variants résistants sur les milieux avec drogue qui est, pour l'essentiel, responsable de cet état de choses. Sauf pour la concentration 2  $\mu\text{g/ml}$ , l'accroissement du taux des variants résistants entre le vingt-cinquième et le quarantième jour est du même ordre de grandeur que pour l'isoniazide. (Aux concentrations très élevées de streptomycine, aucune précision ne peut être donnée, faute d'un nombre de variants suffisant).

On remarquera que pour la concentration 2  $\mu\text{g/ml}$ , l'accroissement des taux entre le vingt-cinquième et le quarantième jour est particulièrement prononcé : dans la mesure où il peut être chiffré (certaines souches montrent au vingt-cinquième jour sur 2  $\mu\text{g/ml}$  des colonies si petites que celles-ci ne peuvent être comptées), l'accroissement médian est de l'ordre de 1 à 20. On se souvient qu'il en est de même pour la concentration 0,05  $\mu\text{g/ml}$  d'isoniazide (accroissement médian de 1 à 12). Ce phénomène tient à l'action conjointe du milieu de culture et de la température de l'étuve sur la concentration d'antibiotique réellement active dans le milieu. Lorsque la concentration *initiale* de l'antibiotique y est déjà très faible, la chute du taux actif devient telle, au bout de quelques jours d'incubation, que des bacilles totalement *sensibles* qui subsistaient dans la semence peuvent se multiplier : d'où la nature sensible de bon nombre des colonies apparues tardivement sur ces concentrations. La conséquence pratique de cet état de choses, c'est que lors d'un test de résistance, il est peu souhaitable de se fier à des modifications de sensibilité qui n'apparaissent que sur ces concentrations

très faibles d'antibiotique ; et en aucun cas ne peut-on s'y fier s'il ne s'agit que de colonies tardives. Ce point sera évoqué plus loin.

b) *Rapports des taux entre eux.* — Ces rapports ne seront considérés que pour les taux moyens, au quarantième jour. Entre le taux de variants noté à 2  $\mu\text{g/ml}$  et celui noté à 4  $\mu\text{g/ml}$ , le rapport est de l'ordre de 100 à 1. Entre les taux à 4  $\mu\text{g/ml}$  et à 10  $\mu\text{g/ml}$ , le rapport est de l'ordre de 20 à 1. Entre les taux à 10  $\mu\text{g/ml}$  et

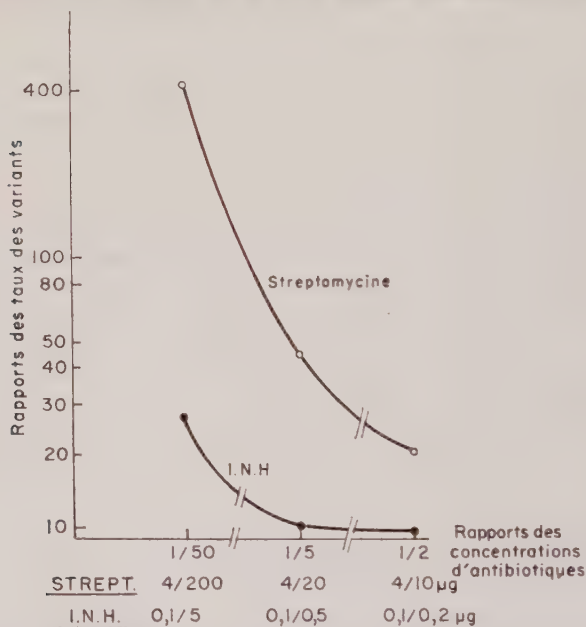


FIG. 1. — Rapports entre les taux des variants résistants à deux concentrations de streptomycine ou d'isoniazide d'écart comparable (souches sauvages ; taux moyens ; quarantième jour).

à 20  $\mu\text{g/ml}$  le rapport est de l'ordre de 2 à 1, et enfin, entre les taux à 20  $\mu\text{g/ml}$  et à 200  $\mu\text{g/ml}$ , il est de 4 à 1 ou de 5 à 1. Tout comme pour l'isoniazide, on constate donc que la limite supérieure de la résistance des bacilles qui se multiplient sur les concentrations faibles de streptomycine (2  $\mu\text{g/ml}$  ou 4  $\mu\text{g/ml}$ ) n'est, pour la plupart d'entre eux, que de peu supérieure à la concentration correspondante. Pour les bacilles qui se multiplient sur les concentrations fortes (10  $\mu\text{g/ml}$  et au-dessus), la limite supérieure de la résistance est assez souvent considérablement plus élevée.

En cette matière, une différence importante existe entre streptomycine et isoniazide, différence déjà signalée autrefois [9, 14] : à accroissement égal de concentration d'antibiotique, la décroissance du taux des variants résistants à la streptomycine se fait plus rapidement que celle du taux des variants résistants à l'isoniazide (fig. 1). Par exemple, entre les concentrations 0,1  $\mu\text{g/ml}$  et 5  $\mu\text{g/ml}$  d'isoniazide, la décroissance des taux des variants résistants est de l'ordre de 30 à 1 : entre les concentrations 4  $\mu\text{g/ml}$  et 200  $\mu\text{g/ml}$  de streptomycine, d'écart égal, la décroissance du taux moyen des variants est de l'ordre de 400 à 1. La différence s'accroît encore pour les concentrations de drogue supérieures. On exprime le même état de choses en disant que, parmi les variants résistants à l'isoniazide ou à la streptomycine qui existent dans les souches sauvages, la proportion de ceux qui sont résistants à une concentration élevée de l'antibiotique est beaucoup plus élevée pour l'isoniazide que pour la streptomycine. Cet état de choses a une incidence directe sur la structure des souches résistantes homologues, ainsi qu'on le verra plus loin.

c) *Fréquence des variants résistants en fonction du nombre d'unités bacillaires viables contenues dans la semence.* — Les tableaux I et II montrent que les semences totales employés pour la détermination des variants ont varié dans des limites assez étroites : pour 24 des 29 souches étudiées, les semences se sont situées entre  $1 \times 10^6$  et  $15 \times 10^6$  bacilles. La moyenne a été de  $7,4 \times 10^6$  bacilles. Pour 5 souches seulement, les semences ont été notablement plus élevées (respectivement  $22 \times 10^6$ ,  $38 \times 10^6$ ,  $50 \times 10^6$ ,  $58 \times 10^6$  et  $170 \times 10^6$  bacilles). Comme il était facile de le prévoir, les semences élevées ont permis plus fréquemment la mise en évidence de variants de résistance élevée (à 5 ou 25  $\mu\text{g}$  d'isoniazide, par exemple), variants qui n'existent dans les souches sauvages qu'en nombre très faible. Mais lorsque de pareils variants ont été trouvés, leur *taux* (nombre pour  $10^6$  bacilles) n'était nullement proportionnel à l'abondance de la semence. Il en a été de même pour les variants de résistance faible : aucune proportionnalité entre le taux des variants et l'abondance de la semence n'a été constatée.

A la concentration 2  $\mu\text{g/ml}$  de streptomycine, il arrive assez souvent que les tubes ensemencés avec les dilutions les plus bacillifères montrent *proportionnellement* un taux de variants résistants plus élevé que les tubes ensemencés avec des dilutions plus faibles. L'exacte nature de ce phénomène, déjà signalé pour la streptomycine par Cohn, Middlebrook et Russel [6], n'est pas encore élucidée. Il s'observe d'ailleurs avec la plupart des agents antibacillaires lorsque leur concentration dans le milieu est très voisine de la concentration minima active. Etant donné les écarts



très faibles entre les semences employées dans notre expérience, ce phénomène n'a pas eu d'incidence sur le point en discussion ici.

d) *Stabilité des taux des variants résistants.* — Pour 7 souches, une seconde détermination du taux des variants a été faite, trois ou quatre mois après la première. Dans trois cas, une diminution non négligeable du taux de la plupart des variants a été constatée ; dans 4 cas, une identité presque complète. Les 7 souches n'avaient pas été entretenues de manière identique dans l'intervalle des deux déterminations de résistance. La question de savoir si les taux absolus des différents variants résistants d'une souche, et les rapports que ces taux affectent entre eux, représentent jusqu'à un certain point une constante, est d'une grande importance théorique. Elle ne pourrait être résolue dans chaque cas que par un nombre considérablement plus élevé de déterminations des taux, et par l'emploi d'un nombre considérablement plus élevé de tubes par détermination.

#### DISCUSSION.

Les faits qui viennent d'être mis en évidence ont une incidence concrète sur plusieurs problèmes importants. A cet égard, il y a lieu de considérer tout particulièrement la nature des colonies apparaissant tardivement sur les milieux avec drogue, la différence de structure entre souches isoniazido-résistantes et souches streptomycino-résistantes, et enfin le choix de critères satisfaisants pour la définition de l'isoniazido- et de la streptomycino-résistance.

##### A. — *Nature des colonies apparaissant tardivement sur les milieux avec drogue.*

On a vu qu'entre le vingt-cinquième et le quarantième jour, le nombre de colonies présentes sur les tubes avec drogues augmente notablement ; l'augmentation, variable selon les souches, est de l'ordre de 100 p. 100 à 200 p. 100. Ce phénomène, déjà signalé autrefois pour les milieux solides (Youmans et Williston [16]) et liquides (Canetti et Saenz [1]), ne peut pas s'expliquer par la persistance, sur le milieu de culture, de bacilles *sensibles*, que la drogue n'aurait pas détruits et qui se multiplieraient tardivement, à la faveur de l'inactivation progressive de l'antibiotique dans le milieu, hypothèse souvent émise. Sauf pour les colonies apparaissant sur les concentrations les plus faibles d'isoniazide et de streptomycine, déjà discutées plus haut, il y a bien intervention de variants *résistants* : deux arguments, l'un direct, l'autre indirect, le prouvent. Si les colonies en question étaient de nature pleinement sensible, leur taux d'augmentation entre le vingt-cin-



quième et le quarantième jour devrait être d'autant plus fort que la concentration initiale de la drogue dans le milieu est plus faible, puisque le retour à des conditions de milieu permettant la multiplication de bacilles sensibles s'opérerait alors plus rapidement et plus sûrement. En fait, il n'existe aucune corrélation entre le taux en question et la concentration d'antibiotique considérée : l'augmentation tardive du nombre de colonies est, en moyenne, aussi forte sur les concentration d'antibiotique élevées que sur les concentrations faibles, ainsi qu'il a été indiqué plus haut. D'autre part, l'étude *directe* de la sensibilité de ces colonies, prélevées isolément, démontre, pour la très grande majorité d'entre elles, qu'il ne s'agit pas de colonies sensibles.

Toutefois, il ne s'agit pas non plus de colonies *homogènement* résistantes à la concentration d'antibiotique sur laquelle elles ont poussé. Des études précises de population montrent que la grande majorité des bacilles qui les composent sont d'une résistance inférieure à celle de la concentration d'origine ; dans la population d'une colonie donnée, on constate habituellement tout un éventail de résistances, et la présence d'une certaine proportion de bacilles sensibles n'est pas rare. En règle générale, et sans qu'il s'agisse d'une relation rigoureuse, la différence entre la résistance escomptée (qui devrait être au moins égale à la concentration de drogue dans le milieu d'origine) et la résistance réellement trouvée, est d'autant plus grande que les colonies sont apparues plus tardivement et ont atteint un volume moindre.

Ce phénomène n'est pas propre aux colonies apparues tardivement. Même les colonies apparues dans des délais normaux, et présentant un volume normal, comportent souvent une proportion importante de bacilles de résistance moindre que celle prévue. La différence est cependant moins marquée que pour les colonies tardives, conformément à la tendance signalée plus haut. Dans cet état de choses encore peu exploré, plusieurs facteurs pourraient être en cause : la chute progressive de la concentration d'antibiotique dans le milieu, la formation possible d'un clone aux dépens de plusieurs variants de résistance différente, des différences de rapidité de multiplication de ces variants, etc. Un facteur particulièrement important est, selon toute vraisemblance, la *variabilité phénotypique des mutants qui sont à l'origine des populations résistantes*, variabilité qui intervient tout particulièrement lors des stades précoces du développement des populations. Les colonies tardives attirent ainsi l'attention sur la complexité des facteurs qui règlent le degré de résistance atteint *in vitro*, et probablement aussi *in vivo*, par les populations résistantes sélectionnées. D'un point de vue pratique, elles montrent qu'il existe pour les tests de résistance un problème de *date de lecture* des résultats : l'habituelle lecture précoce des tests (vingt-cinquième-quarantième

jour) n'est pas toujours suffisante pour déceler les modifications de sensibilité des souches, surtout s'il s'agit de tests directs et de modifications commençantes.

B. — *Différence de structure entre souches isoniazido-résistantes et souches streptomycino-résistantes.*

Des études de population portant sur plusieurs centaines de souches isoniazido-résistantes et de souches streptomycino-résistantes, provenant de foyers tuberculeux réséqués après chimiothérapie, nous ont montré une différence de structure importante entre ces deux sortes de souches. A durée égale d'administration de l'antibiotique correspondant, une résistance *homogène* aux concentrations *élevées* s'observe beaucoup plus souvent pour les souches résistantes à l'isoniazide que pour celles résistantes à la streptomycine (Canetti et Grosset [4]). Deux facteurs indépendants de la structure initiale des souches sauvages interviennent peut-être dans cet état de choses : le fait que l'isoniazide soit donné quotidiennement, alors que la streptomycine n'est donnée que tous les deux ou trois jours, tout au moins sur de longues périodes; et surtout, la meilleure diffusibilité de l'isoniazide, qui doit atteindre les bacilles des foyers à une concentration sensiblement égale, quelle que soit leur localisation, alors que la streptomycine, qui pénètre fort mal à l'intérieur des macrophages, doit atteindre les bacilles des foyers selon tout un éventail de concentrations, dont certaines très faibles. Mais la structure initiale des souches est également en cause. On a vu plus haut que les souches sauvages contiennent dix fois plus de variants résistants à 25 µg/ml d'isoniazide que de variants résistants à 200 µg/ml de streptomycine : le développement beaucoup plus fréquent de souches homogènement résistantes à de fortes concentrations d'isoniazide en est une conséquence directe. Par rapport aux résistances aux autres agents bacillaires, ce caractère distinctif de l'isoniazido-résistance est encore plus tranché.

C. — *Choix de critères pour la définition de l'isoniazido-résistance et de la streptomycino-résistance.*

La connaissance exacte de la structure des souches sauvages est fondamentale pour le choix de bons critères en matière de résistance. On sait avec quelle fréquence des souches résistantes aux agents antibacillaires se développent au cours de la chimiothérapie de la tuberculose, tout au moins au cours des traitements imparfaits, encore si répandus. De ce fait, le problème des critères de la résistance revêt une importance pratique consi-

dérable. Or, il règne actuellement en ce domaine une véritable anarchie : d'un laboratoire à l'autre, les critères adoptés diffèrent souvent considérablement, et cet état de choses, sur lequel l'attention a été attirée à plusieurs reprises [2, 3, 13], a des conséquences très graves pour la conduite des traitements. Une discussion approfondie de tous les facteurs à prendre en considération lors du choix des critères de résistance ne peut être entreprise ici ; mais quelques remarques s'imposent.

La résistance des souches de bacilles tuberculeux à un antibiotique donné doit être définie par rapport à 4 paramètres : le milieu de culture, la date de lecture de l'ensemencement, la concentration-critique d'antibiotique, enfin la proportion de bacilles résistants à cette concentration, sur le total de la population bacillaire. Les deux premiers facteurs ont déjà été évoqués. Le choix de la *concentration-critique* d'antibiotique, c'est-à-dire de la concentration minima sur laquelle il doit y avoir culture pour que la souche soit classée comme résistante, évolue entre deux écueils. Si la concentration-critique est placée trop haut, des souches déjà résistantes, c'est-à-dire non influençables par les concentrations d'antibiotique réalisées en clinique, ne sont pas identifiées comme telles et, partant, considérées comme sensibles. C'est ce qui arrive dans beaucoup de laboratoires, du fait de certains critères ayant cours actuellement (par exemple 1  $\mu\text{g/ml}$  d'isoniazide et 10  $\mu\text{g/ml}$  de streptomycine), ainsi que l'enquête récente de Rist et Crofton [13] l'a bien montré. Si, à l'inverse, la concentration-critique est placée trop bas, les risques d'erreur sont d'un autre ordre. Divers travaux expérimentaux et cliniques ont montré que même des résistances très faibles sont significatives cliniquement : la tendance à placer la concentration-critique très bas n'est donc point critiquable en elle-même. Mais les irrégularités propres à la préparation de chaque nouveau lot de milieu de culture, avec le retentissement qu'elles ont sur la concentration d'antibiotique qui subsiste dans le milieu, ont une incidence d'autant plus grande sur le résultat du test que la concentration initiale d'antibiotique est plus faible : l'énorme variation des taux de variants relevés sur 2  $\mu\text{g/ml}$  de streptomycine et, à un degré moindre, sur 0,05  $\mu\text{g/ml}$  d'isoniazide, en fournit la preuve. Aussi une résistance constatée à ces deux concentrations d'antibiotique ne peut-elle être considérée comme sûre que si certaines conditions particulières de rigueur du test ont été respectées, ce que l'on ne saurait escompter de la part d'un grand nombre de laboratoires. La fixation de la concentration-critique se trouve ainsi prise entre deux exigences contradictoires, et jusqu'à un certain point inconciliables : la solution adoptée doit donc être un compromis.

Le dernier facteur à considérer dans la définition de la résistance, *la proportion de bacilles résistants à la concentration-*

*critique*, sur le total de la population bacillaire, est étroitement lié au précédent ; la proportion exigible est d'autant plus faible que la concentration-critique choisie est plus élevée. En fait, les divers critères de résistance actuellement employés oscillent entre deux tendances : une concentration-critique élevée, jointe à une proportion de bacilles résistants très faible, et une concentration-critique basse, jointe à une proportion de bacilles résistants un peu plus élevée. Si les taux associés dans chaque critère sont judicieusement choisis, les deux solutions sont théoriquement équivalentes. Toutefois la seconde solution, outre qu'elle comporte une sécurité statistique plus grande, offre l'avantage de ne point faire méconnaître certaines souches résistantes dans lesquelles l'accroissement du taux des variants résistants se limite strictement aux variants de résistance faible, sans retentissement aucun sur les variants de résistance élevée, éventualité d'ailleurs rare.

De toute manière, puisqu'une souche résistante se définit par la *proportion* de bacilles résistants qu'elle contient à une concentration donnée d'antibiotique, la nécessité de donner aux tests de résistance un caractère *quantitatif* apparaît impérieusement : la proportion en question ne peut être calculée sans une connaissance au moins approximative du *nombre* de colonies présentes sur les milieux sans antibiotique, ce qui indique la population bacillaire totale, et du *nombre* de colonies présentes sur les milieux avec antibiotique, ce qui indique sa part résistante. Cette nécessité, qui implique l'ensemencement de plus d'une dilution de la suspension bacillaire, n'est point clairement comprise à l'heure actuelle, et très peu de laboratoires s'y soumettent. Or, elle peut être satisfaite sans complication technique excessive, l'expérience le prouve. Il est hautement souhaitable que sur ce point, comme sur celui des critères de résistance en général, l'état de choses actuel soit réformé. Il importe aussi qu'il le soit par un organisme à audience internationale, afin qu'une réforme éventuelle ait quelques chances d'être acceptée.

#### RÉSUMÉ.

Une détermination du taux des variants résistants à l'isoniazide et des variants résistants à la streptomycine a été faite pour 22 souches sauvages de *Mycobacterium tuberculosis* sur milieu de Loewenstein-Jensen. Aux concentrations très faibles (0,05 µg/ml d'isoniazide et 2 µg/ml de streptomycine), les taux des variants résistants sont extrêmement variables d'une souche à l'autre. Aux concentrations supérieures, l'amplitude des variations diminue : pour 0.1 µg/ml d'isoniazide ou 4 µg/ml de streptomycine, on observe de 1 à 100 variants résistants sur 10<sup>6</sup> bacilles viables. Beaucoup de variants résistants ont une croissance dys-



gonique sur les milieux avec drogue. La proportion de variants résistants aux très fortes concentrations de drogue est beaucoup plus élevée pour l'isoniazide que pour la streptomycine.

Divers problèmes sont discutés à la lumière de ces constatations : la nature des colonies apparaissant tardivement sur les milieux avec drogue, la différence de structure entre souches isoniazido-résistantes et souches streptomycino-résistantes, enfin le choix de critères satisfaisants pour la définition de l'isoniazido- et de la streptomycino-résistance.

## SUMMARY

FREQUENCY OF ISONIAZIDO-RESISTANT VARIANTS AND STREPTOMYCINO-RESISTANT VARIANTS IN WILD STRAINS OF *Mycobacterium tuberculosis* ON LOEWENSTEIN-JENSEN MEDIUM.

Determination of the frequency of isoniazido-resistant and streptomycino-resistant variants was carried out with 22 wild strains of *M. tuberculosis* on Loewenstein-Jensen medium.

At the very low concentrations (0,05 µg/ml for isoniazid and 2 µg/ml for streptomycin), the frequency of resistant variants is extremely different from one strain to another. At higher concentrations, the number of variations decreases : with 0,1 µg/ml isoniazid or 4 µg/ml streptomycin, 1 to 100 resistant variants out of 10<sup>6</sup> viable bacilli are demonstrated.

Many resistant variants show a dysgonic growth on media containing antibiotics.

Variants resistant to very high concentrations of antibiotic are much more frequent with isoniazid than with streptomycin.

Different problems are discussed in the light of these observations : nature of colonies appearing after prolonged lag time on antibiotic containing media, structural difference between isoniazido-resistant and streptomycino-resistant strains, choice of satisfactory criteria for the definition of isoniazido- and streptomycino-resistance.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] CANETTI (G.) et SAENZ (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **77**, 611.
- [2] CANETTI (G.). *Bull. Un. int. Tuberc.*, 1955, **25**, 157.
- [3] CANETTI (G.). *Bull. Un. int. Tuberc.*, 1957, **27**, 222.
- [4] CANETTI (G.) et GROSSET (J.). [Observations non encore publiées].
- [5] COHN (M. L.), ODA (U.), KOVITZ (C.) and MIDDLEBROOK (G.). *Amer. Rev. Tuberc.*, 1954, **70**, 465.
- [6] COHN (M. L.), MIDDLEBROOK (G.) and RUSSEL (W. F.). *J. Clin. Invest.*, 1959, **38**, 1349.
- [7] COLWELL (C. A.), PITNER (G.) and MORAVEC (M.). *Amer. Rev. Tuberc.*, 1951, **63**, 679.



- [8] GROSSET (J.) et CANETTI (G.). *Ann. Inst. Pasteur* (sous presse).
  - [9] MIDDLEBROOK (G.). *Amer. Rev. Tuberc.*, 1952, **65**, 765.
  - [10] MIDDLEBROOK (G.). *Bull. Un. int. Tuberc.*, 1956, **26**, 185.
  - [11] MITCHISON (D. A.). *Thorax*, 1950, **5**, 144.
  - [12] PYLE (M. M.). *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.*, 1947, **22**, 465.
  - [13] RIST (N.) and CROFTON (G.). *Bull. Un. int. Tuberc.*, 1960 **30**, 1.
  - [14] SZYBALSKI (W.) and BRYSON (V.). *Amer Rev. Tuberc.*, 1952, **65**, 768.
  - [15] YEGIAN (D.) and VANDERLINDE (R. I.). *J. Bact.*, 1948, **56**, 117.
  - [16] YOUMANS (G. P.) and WILLISTON (E. H.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1948, **68**, 458.
-

## SENSIBILITÉ DE BACTÉRIES DE DIFFÉRENTS GENRES AU THIOPHÉNICOL

par A.-L. COURTIEU, Cécile LONGERAY, Claudine MIRAILLET,  
Marie-France COLOMBET et Andrée BADIOU (\*).

(Institut Pasteur de Lyon)

Le chloramphénicol, un des antibiotiques dont le spectre antibactérien est le plus large, présente des inconvénients d'administration liés à la toxicité du produit sur l'hématopoïèse. Des recherches ont été entreprises pour obtenir de nouveaux dérivés toujours actifs, mais dépourvus de toxicité. Malheureusement, presque tous les corps synthétisés étaient inactifs ou d'une activité trop réduite pour être utilisables, particulièrement les dérivés formés par substitution sur la chaîne latérale. Des essais entrepris pour remplacer le groupement  $\text{NO}_2$  ont permis de mettre au point d'autres substances parmi lesquelles le thiophénicol (Cutler et coll. [2]).

Le thiophénicol est le (méthanesulfonyl-4 phényl)-1 hydroxyméthyl-2 aza-3 oxo-4 dichloro 5,5 pentane. Son spectre antibactérien est superposable à celui du chloramphénicol ; les souches résistantes à ce dernier sont aussi résistantes au thiophénicol. Dans l'ensemble, pour les souches sensibles, l'activité du thiophénicol est plus réduite que celle du chloramphénicol, sauf pour certains genres ou espèces qui sont aussi sensibles aux deux antibiotiques : streptocoques, *Pasteurella*, *Brucella*, *Shigella*, *Pseudomonas* et *Erysipelothrix* [4, 8, 9].

Le thiophénicol est sans action sur la coccidioïdomycose (Dennis et Hansen [3]), mais agit sur les rickettsies de la fièvre pourprée des Montagnes Rocheuses, du typhus épidémique, du typhus murin et de la rickettsiose varicelliforme. Cette action est comparable à celle du chloramphénicol et de l'oxytétracycline (Ormsbee et coll. [5]).

Laplassotte et Brunaud [4] ont montré qu'*in vitro* il est facile d'obtenir des souches résistantes à partir de souches sensibles. Les souches devenues résistantes au thiophénicol le sont aussi au chloramphénicol et vice versa. En même temps, de telles souches apparaissent moins sensibles à la pénicilline et à l'oxytétracycline.

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 2 mars 1961.

Une particularité intéressante de ce nouveau produit est son élimination à l'état actif dans les urines, où il est possible d'obtenir de très fortes concentrations [4, 7, 9]. Les concentrations sanguines sont moins élevées que celles du chloramphénicol et leur maximum après l'absorption orale est plus tardif : trois à quatre heures (Laplassotte et Brunaud [4]).

Nous avons voulu rechercher la sensibilité de diverses bactéries appartenant à des genres et des espèces différents, au thiophénicol.

#### MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

1° SOUCHES MICROBIENNES. Nous avons choisi 344 souches qui ont toutes été mises en présence de thiophénicol. Parmi elles, 340 ont aussi été expérimentées vis-à-vis du chloramphénicol.

La majorité de ces souches ont été isolées au Service de Microbiologie de l'Institut Pasteur de Lyon. Presque toutes étaient d'origine très récente et n'avaient subi que fort peu de repiquages. Nous avons joint quelques souches de collection : *Pediococcus cerevisiae* ATCC 8081, et des *Lactobacillus*. Pour les *Shigella* nous avons étudié le comportement de toutes nos souches isolées depuis 1955. De même pour les *Escherichia coli* appartenant aux trois sérotypes de gastro-entérites infantiles (0,26 : B,6. 0,55 : B,5. 0,111 : B,4) nous avons repris des souches isolées ces dernières années au cours de diverses épidémies de collectivités hospitalières, et dont la résistance au chloramphénicol était presque la règle. Enfin pour les *Moraxella glucidolytica* (*B. anitratum*), nous avons joint quelques souches de provenance étrangère qui nous avaient été confiées par M<sup>me</sup> Erna Lund (Copenhague), Miss Elizabeth O. King (Chamblee), les D<sup>rs</sup> H. P. R. Seeliger (Bonn) et K. Simon (Kiel). Nous signalons tout de suite que toutes ces souches se sont comportées de la même façon vis-à-vis des deux antibiotiques.

2° MILIEUX. Les épreuves de sensibilité ont été effectuées sur gélose nutritive. C'est la gélose spéciale pour la détermination de la sensibilité aux antibiotiques, fabriquée par l'Institut Pasteur, qui a été choisie. Ce milieu a la composition suivante :

Bouillon concentré Debat (digestion papaïnique de cœur de bœuf) .....	100 ml
Eau .....	900 ml
Peptone pancréatique de caséine S. C. (Réactifs)...	6 g
Gélose .....	15 g
Glucose pur .....	2 g
pH final 7-7,1.	

Pour les *Lactobacillus* la gélose a été additionnée de 5 p. 100 de sang de cheval défibriné. Les *Bordetella pertussis* et les *B. paraptussis* ont été cultivées sur milieu de Bordet-Gengou à 20 p. 100 de sang de mouton.

3° TECHNIQUE. Nous avons utilisé une technique de dilutions sériées sur milieu solide. Cette technique a été la même que celle employée

pour un travail précédent (Courtieu et coll. [1]). Les concentrations finales de chaque antibiotique s'étagaient entre 0,4 et 100  $\mu\text{g/ml}$ . La gélose contenant les dilutions d'antibiotiques était coulée en boîte de Petri de 10 cm de diamètre. Quinze germes étaient ensemencés simultanément sur une même boîte. Sur chaque boîte une souche témoin (*E. coli* souche A. 224-Monod) était introduite. Cette souche était généralement sensible à 12,5  $\mu\text{g/ml}$  de thiophénicol, parfois à 25 ou 6,25  $\mu\text{g/ml}$ .

## RÉSULTATS ET DISCUSSION.

Nous avons réuni nos résultats sur plusieurs tableaux. Dans le tableau I ne figurent que 9 souches représentant 6 genres différents. Ces germes sont en trop petit nombre pour donner une

TABLEAU I. — Genres microbiens représenté par un petit nombre de souches.

	NOMBRE DE SOUCHES	NOMBRE DE SOUCHES SENSIBLES (taux en $\mu\text{g/ml}$ )							NOMBRE DE SOUCHES RÉSISTANTES (à 100 $\mu\text{g/ml}$ )
		1,6	3,1	6,2	12,5	25	50	100	
<i>Streptococcus D</i> (entérocoques):									
Thiophénicol .....	3			I	I				I
Chloramphénicol .....		I						I	I
<i>Pediococcus cerevisiae</i> :									
Thiophénicol .....	I				I				
Chloramphénicol .....					I				
<i>Cloaca</i> :									
Thiophénicol .....	I								I
Chloramphénicol .....									I
<i>Klebsiella</i> :									
Thiophénicol .....	2								2
Chloramphénicol .....									2
<i>Alcaligenes faecalis</i> :									
Thiophénicol .....	I							I	
Chloramphénicol .....				I					
<i>Chromobacterium violaceum</i> :									
Thiophénicol .....	I			I					
Chloramphénicol .....				I					

idée de la sensibilité globale d'un genre tout entier. Sur les 3 streptocoques du groupe D, l'un est insensible à 100  $\mu\text{g/ml}$  des deux antibiotiques, l'autre est plus sensible au thiophénicol qu'au chloramphénicol, alors que le troisième se comporte à l'inverse du second. Laplassotte et Brunaud [4] avaient trouvé leurs souches sensibles aux mêmes taux.

Les 3 souches de *Klebsiella* et de *Cloaca* sont insensibles à 100  $\mu\text{g/ml}$  des deux antibiotiques, alors que Laplassotte et Brunaud [4], avec 6 souches n'en trouvent que deux résistantes au même taux ; Trivellato et Malesani [8] avaient constaté pour leur souche d'*Aerobacter aerogenes* une sensibilité à 60  $\mu\text{g/ml}$  pour le chloramphénicol et une résistance à 100  $\mu\text{g/ml}$  de thiophénicol.

Les trois espèces et le genre figurant au tableau II sont tous plus sensibles au thiophénicol qu'au chloramphénicol. Sur 38 souches de *B. pertussis*, 37 sont sensibles à 0,4  $\mu\text{g/ml}$  (taux le plus bas recherché dans notre expérimentation). Le thiophénicol est donc particulièrement actif sur le bacille de Bordet-Gengou.

TABLEAU II. — Germes plus sensibles au thiophénicol qu'au chloramphénicol.

	NOMBRE DE SOUCHES	NOMBRE DE SOUCHES SENSIBLES (taux en $\mu\text{g/ml}$ )								
		0,4	0,8	1,6	3,1	6,2	12,5	25	50	100
<i>Bordetella pertussis</i> :										
Thiophénicol .....	38	37	1							
Chloramphénicol .....	40		2	38						
<i>Bordetella parapertussis</i> :										
Thiophénicol .....	6				6					
Chloramphénicol .....	5				5					
<i>Shigella sonnei</i> :										
Thiophénicol .....	15		1	5	8	1				
Chloramphénicol .....	15		1		7	7				
<i>Lactobacillus</i> :										
Thiophénicol .....	13				1	4	6	2		
Chloramphénicol .....	13					4	1	2	1	5

*B. parapertussis* est un peu moins sensible (3,1  $\mu\text{g/ml}$ ) mais l'est au même taux pour les deux antibiotiques. Nous avons fait figurer sur ce tableau *Shigella sonnei*, car cette espèce a montré un comportement d'ensemble légèrement différent de celui des deux autres espèces de *Shigella* qui figurent au tableau IV.

Sur les 15 souches éprouvées, 3 sont sensibles aux mêmes taux des deux antibiotiques, 1 est plus sensible au chloramphénicol et les 11 autres sont plus sensibles au thiophénicol (deux à quatre fois plus qu'au chloramphénicol). Or nos souches, bien que toutes isolées dans la région lyonnaise, appartiennent à des types biochimiques et à des lysotypes différents. Le taux moyen de sensibilité des *Shigella sonnei* est inférieur à 3,1  $\mu\text{g/ml}$  au thiophénicol, alors qu'il est légèrement supérieur pour le chloramphénicol. Pour leur souche, Laplassotte et Brunaud avaient constaté une



sensibilité à 3,1 pour les deux antibiotiques. Les *Lactobacillus* ont un comportement d'ensemble homogène, bien qu'ils comportent 7 souches de collection réparties en quatre espèces (*L. acidophilus*, *L. fermenti*, *L. casei* et *L. leishmanii*) et 6 souches isolées au laboratoire sous l'étiquette de bacille de Döderlein. Deux de ces souches sont également sensibles aux deux anti-

TABLEAU III. — *Escherichia coli*.

	NOMBRE DE SOUCHES	NOMBRE DE SOUCHES SENSIBLES (taux en µg/ml)							NOMBRE DE SOUCHES RÉSISTANTES (à 100 µg/ml)
		1,6	3,1	6,2	12,5	25	50	100	
<i>Escherichia coli</i> (divers) :									
Thiophénicol.....	12			1	1	2	6	1	1
Chloramphénicol.....	11		6	3	1				1
<i>E. coli</i> ( <i>alkalescens-dispar</i> ) :									
Thiophénicol.....	5					2	2	1	
Chloramphénicol.....	5		2	2		1			
<i>E. coli</i> : O, 26 : B, 6 :									
Thiophénicol.....	12					2	4	1	5
Chloramphénicol.....	12		3	4					5
<i>E. coli</i> : O, 55 : B, 5 :									
Thiophénicol.....	22					4	9	1	8
Chloramphénicol.....	22		7	7					8
<i>E. coli</i> : O, 111 : B, 4 :									
Thiophénicol.....	46					1	2	2	41
Chloramphénicol.....	45			3					42
<i>E. coli</i> : O, 119 : B, 14 :									
Thiophénicol.....	1						1		
Chloramphénicol.....	1			1					
<i>E. coli</i> : O, 126 : B, 16 :									
Thiophénicol.....	2						2		
Chloramphénicol.....	2			2					
<i>E. coli</i> : O, 127 : B, 8 :									
Thiophénicol.....	46			2		1	15	11	17
Chloramphénicol.....	46	1	8	18	2				17
<i>E. coli</i> : O, 128 : B, 12 :									
Thiophénicol.....	2						1		1
Chloramphénicol.....	2		1						1

biotiques, deux autres sont deux fois plus sensibles au chloramphénicol ; les 9 autres souches sont toutes plus sensibles au thiophénicol (deux à seize fois). Cette constatation pourrait suggérer que ce dernier antibiotique fût susceptible de retenir de façon plus marquée sur la flore lactique intestinale au cours de son administration thérapeutique.

Le tableau III ne comporte que des *Escherichia coli*. On

y trouve sept sérotypes de gastro-entérites infantiles, des *E. coli* immobiles et non gazogènes appartenant au groupe *alkalescens-dispar* (4 souches du sérotype 0,5 et une du sérotype 0,1) et une douzaine de souches non caractérisées sérologiquement mais n'appartenant pas aux sérotypes précédents. Comme nous l'avons dit plus haut, nous rappelons que les souches des sérotypes 0,26 : B,6, 0,55 : B,5, 0,111 : B,4 ne sont pas, dans leur presque totalité, des souches récemment isolées. Toutes les souches trouvées résistantes au chloramphénicol le sont vis-à-vis du thiophénicol. Sur l'ensemble des *E. coli* une seule souche, appartenant au sérotype 0,111 : B,4 s'est montrée deux fois plus sensible au thiophénicol ; toutes les autres souches sensibles sont de quatre à trente-deux fois plus sensibles au chloramphénicol. Laplassotte et Brunaud [4] ont trouvé toutes leurs souches sensibles au chloramphénicol, et des taux de sensibilité quatre à seize fois moins bons pour le thiophénicol. Trivellato et Malesani [8], avec deux souches, ont observé des différences de vingt à vingt-cinq fois en défaveur du thiophénicol. Une remarque est à faire pour les *E. coli* des gastro-entérites infantiles : l'antibioprophylaxie s'est de plus en plus répandue dans les collectivités hospitalières et le nombre de souches résistantes s'élève au fur et à mesure du développement des épidémies. Il n'est donc pas anormal que nos souches soient, en grand nombre, résistantes au chloramphénicol et par corollaire au thiophénicol. Les *E. coli* d'infections urinaires sont généralement sensibles. Sur 11 souches d'*E. coli*, nous n'en avons observé qu'une seule résistante au chloramphénicol (et au thiophénicol).

Le tableau IV réunit tous les autres germes qui ont fait partie de notre expérimentation. On peut noter la grande sensibilité des *Shigella dysenteriae* et *Sh. flexneri*, ce qui correspond aux constatations de Laplassotte et Brunaud [4]. Ces deux espèces, d'après nos résultats, sont cependant légèrement plus sensibles au chloramphénicol (deux fois). Les staphylocoques sont, en majorité, sensibles. Nos 32 souches sont toutes des staphylocoques dorés coagulase-positifs. Les *Salmonella* sont relativement sensibles, parmi celles-ci les *S. paratyphi* B exigent des taux plus élevés pour l'inhibition de leur développement. Une seule souche résiste à 100 µg/ml des deux antibiotiques : il s'agit d'une souche de *S. typhi murium* isolée au cours d'une gastro-entérite traitée au chloramphénicol. La souche initiale isolée avant le début du traitement était sensible à 6,25 µg/ml de chloramphénicol et à 25 µg/ml de thiophénicol. A part le cas de cette souche, nos résultats concordent avec ceux de Laplassotte et Brunaud [4] et ceux de Shaffer et coll. [6]. Ces derniers auteurs, expérimentant avec 32 souches de *Salmonella* appartenant à des sérotypes des groupes A à E, constatent que la majorité sont inhibées par

15 à 30 µg/ml de thiophénicol ; que ce produit est *in vitro* moins actif que le chloramphénicol, mais qu'*in vivo* sur les volailles et les souris son action est supérieure à celle du chloramphénicol.

TABLEAU IV. — Autres germes.

	NOMBRE DE SOUCHES	NOMBRE DE SOUCHES SENSIBLES (taux en µg/ml)									NOMBRE DE SOUCHES RÉSISTANTES (à 100 µg/ml)
		0,4	0,8	1,6	3,1	6,2	12,5	25	50	100	
<i>Staphylococcus aureus</i> :											
Thiophénicol ....	32			3	10	5	6	4	1	1	2
Chloramphénicol.	32		1	12	4	5	4	2	2	2	
<i>Proteus</i> :											
Thiophénicol ....	8						2	1	3	1	1
Chloramphénicol.	8					3	1	2	1		1
<i>Salmonella typhi</i> :											
Thiophénicol ....	2							2			
Chloramphénicol.	2					2					
<i>Salmonella paratyphi B</i> :											
Thiophénicol ....	10					1	1		3	5	
Chloramphénicol.	10				2	2	5	1			
<i>Salmonella</i> diverses :											
Thiophénicol ....	13					1	8	3			1
Chloramphénicol.	13				10	2					1
<i>Shigella dysenteriae</i> :											
Thiophénicol ....	1		1								
Chloramphénicol.	1	1									
<i>Shigella flexneri</i> :											
Thiophénicol ....	3			3							
Chloramphénicol.	3		3								
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> :											
Thiophénicol ....	21							8		9	4
Chloramphénicol.	21							2	5	12	2
<i>Moraxella lwoffii</i> :											
Thiophénicol ....	1										1
Chloramphénicol.	1						1				
<i>Moraxella glucidolytica</i> (Bact. anitratum) :											
Thiophénicol ....	24						1				24
Chloramphénicol.	21		1		1	2	4	7	6		

Janbon et coll. [3 bis] ont pu confirmer ces résultats de laboratoire en traitant 12 cas de fièvre typhoïde : le produit s'est montré actif ; des rechutes sont possibles, mais sont aussi sensibles au traitement.

Les *Pseudomonas aeruginosa* sont peu sensibles, mais à des

taux à peu près égaux pour les deux antibiotiques. Nos résultats sont un peu plus favorables que ceux rapportés par Laplassotte et Brunaud [4] et par Trivellato et Malesani [8]. Enfin, pour les *Moraxella* (*Acinetobacter*), toutes les souches relativement sensibles au chloramphénicol sont résistantes à 100 µg/ml de thiophénicol.

#### RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Dans ce travail sont rapportés les résultats, obtenus par une technique de dilutions en série sur gélose, de l'action inhibitrice du thiophénicol vis-à-vis de 344 souches microbiennes appartenant à une vingtaine de genres ou espèces différents. Ces résultats ont été comparés à ceux fournis par le chloramphénicol. En général, ce dernier est plus actif, mais les *Bordetella pertussis*, les *Shigella sonnei* et les *Lactobacillus* sont plus sensibles au thiophénicol. L'intérêt de cet antibiotique, dont différents auteurs ont montré les hautes concentrations actives dans les urines, peut être très grand dans le traitement des infections urinaires, mais certaines infections générales à germes très sensibles peuvent être justiciables de son emploi.

#### SUMMARY

##### SENSITIVITY TO THIOPHENICOL OF BACTERIA BELONGING TO VARIOUS GENERA.

Study, by means of a serial dilution technique in agar, of the inhibitory activity of thiophenicol against 344 bacterial strains belonging to twenty different genera or species. The results obtained are compared with those obtained with chloramphenicol. As a rule, chloramphenicol is more active than thiophenicol; but *Bordetella pertussis*, *Shigella sonnei* and *Lactobacilli* are more sensitive to thiophenicol.

This therapeutic efficacy of thiophenicol may be very useful in urinary infections; high active concentrations have been demonstrated by various authors in urine of treated patients. It might also be useful in certain systemic infections due to very sensitive germs.

#### BIBLIOGRAPHIE.

- [1] COURTIEU (A.-L.), MONNIER (J.-J.), LAJUDIE (P. DE) et GUILLERMET (F.-N.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, **100**, suppl. au n° 4, 14-31.
- [2] CUTLER (R. A.), STENGER (R. J.) and SUTER (C. M.) *J. Amer. chem. Soc.*, 1952, **74**, 5475-5481.
- [3] DENNIS (J. L.) and HANSEN (A. E.). *Pediatrics*, 1954, **14**, 481-494.

- [3 bis] JANBON (M.), BRUNEL (D.), BERTRAND (A.) et ALLIEU (Y.). *Soc. Sci. Méd. Biol. Montpellier*, séance du 6 janvier 1961 (à paraître).
  - [4] LAPLASSOTTE (J.) et BRUNAUD (M.). *Thérapie*, 1961 (à paraître).
  - [5] ORMSBEE (R.-A.), PARKER (H.) and PICKENS (E. G.). *J. inf. Dis.*, 1955, **96**, 162-167.
  - [6] SHAFFER (M.-F.), MILNER (K.-C.), CLEMMER (D. I.), POTASH (L.) and SHAFFER (L.-S.). *Antibiot. Chemother*, 1954, **4**, 992-1006.
  - [7] TRIVELLATO (E.) e VETTORI (G.). *Urologia*, 1958, **25**, 351-356.
  - [8] TRIVELLATO (E.) e MALESANI (L.). *Urologia*, 1958, **25**, 356-359.
  - [9] VETTORI (G.) e TRIVELLATO (E.). *Pharm. Mediterranea*, 1958, **2**, 347-351.
-



# DOSAGE DU POUVOIR BACTÉRICIDE DES SÉRUMS PAR MESURE DE LA RESPIRATION BACTÉRIENNE

## APPLICATION A L'ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS DES SÉRUMS HYPERGAMMAGLOBULINIQUES

par R. VARGUES, B. GRENIER et B. MORAUD (\*)

(*Centre de Recherche de l'Ecole de Médecine de Tours.*  
[Directeur : Professeur E. ARON].)

L'étude du taux des  $\gamma$ -globulines des sérums humains a conduit les observateurs à dégager le paradoxe suivant : les maladies fortement immunisantes, vaccine, fièvre typhoïde, typhus par exemple, qui provoquent la formation d'anticorps spécifiques aisément décelables, ne s'accompagnent pas d'hyper- $\gamma$ -globulinémie manifeste ; au contraire, des maladies peu immunisantes comme les parasitoses sanguines, les endocardites bactériennes, les septicémies prolongées, ou des maladies non infectieuses comme la cirrhose du foie, sont des affections qui s'accompagnent d'une forte augmentation du taux des  $\gamma$ -globulines sériques. L'observation montre en outre que les sujets dont le sérum est riche en  $\gamma$ -globulines ne sont pas pour autant à l'abri des complications infectieuses ; les cirrhotiques ou les malades atteints de dysprotéinémie se révèlent très sensibles aux infections.

Pour étudier la signification des hyper- $\gamma$ -globulinémies nous avons dosé diverses propriétés immunologiques dans le sérum de ces malades. D'une part, nous avons constaté une augmentation du taux des agglutinines naturelles anti-hématies de mouton et anti-pyocyaniques (Vargues et Grenier [13]) ; d'autre part, nous relevons chez les cirrhotiques une baisse du taux du complément sérique (Vargues [14]). En poursuivant ces recherches nous avons été amenés à étudier le pouvoir bactéricide des sérums humains en mettant en œuvre une technique basée sur la mesure de l'activité respiratoire des germes en présence de sérums.

(\*) *Société Française de Microbiologie, séance du 2 mars 1961.*

Ce travail comprend deux parties :

La première est consacrée à l'étude de la technique mise en œuvre.

Dans la deuxième, nous rapportons les résultats fournis par 130 sérums hyper- $\gamma$ -globuliniques et en discutons la signification.

## PREMIÈRE PARTIE

### TECHNIQUE DE DOSAGE DU POUVOIR BACTÉRICIDE.

Les techniques classiques comprennent deux temps distincts. Dans le premier temps on met en présence des quantités variables de bactéries avec un volume fixe de sérum, ou inversement un volume variable de sérum avec une quantité définie de bactéries ; on laisse agir le sérum pendant une heure environ à 37°. Dans le deuxième temps, on fait des numérations en cultivant les bactéries restées viables après action du sérum. A partir de ce schéma les modalités techniques sont très nombreuses.

Jeanneney et ses collaborateurs [9], en 1938, utilisent 12 suspensions de germes, de  $10^9$  à  $10^3$ /ml. A 0,25 ml de chacune des suspensions, on ajoute 0,25 ml de sang citraté. Après trente minutes de contact à 20°, on compte les germes de chaque mélange en inoculant 0,0025 ml dans les boîtes de Petri contenant de la gélose fondue.

Fricker [8], en 1952, utilise une même quantité de sérum (sérum dilué au 1/12 dans le volume final de la réaction) et des quantités de germes comprises entre  $10^9$  à  $10^0$ . Après une heure d'étuve, les numérations sont faites à une puissance 10 près en ajoutant à chaque mélange 10 ml de bouillon nutritif.

En 1956, Muschel [11] utilise des suspensions microbiennes identiques et fait varier les quantités de sérum. Après une heure de contact, chaque tube reçoit 5 ml de bouillon nutritif. Les auteurs suivent opacimétriquement le développement des germes et en déduisent la valeur de l'inoculat.

En 1957, Fabiani et Despaux [6], recherchant le pouvoir bactéricide du sérum de rat sain ou impaludé, utilisent 3 dilutions sériques (1/50, 1/100 et 1/200) pour un nombre constant de bactéries (6 000 germes/ml).

Toutes ces méthodes sont critiquables. Non seulement elles exigent de longues manipulations qui doivent être effectuées avec le maximum de stérilité (en particulier le sérum doit être prélevé et conservé stérilement), elles nécessitent une verrerie importante (tubes, boîtes de Petri, pipettes), mais surtout elles sont entachées d'erreurs systématiques en raison soit des dilutions de

sérum, soit de l'ajustement du nombre des germes bactériens contenus dans un volume donné de suspension, soit enfin en raison des erreurs qui affectent toute numération de germes vivants.

La méthode que nous avons choisie pour nos recherches mesure le pouvoir bactéricide par détermination de l'activité respiratoire des bactéries. En effet, comme le soulignent Lambin et coll. [40], la plupart des essais effectués avec l'appareil de Warburg montrent que la consommation d'oxygène est directement proportionnelle au nombre de germes en expérience.

### *Principes généraux de la technique.*

La souche d'*Escherichia coli* provient de la collection de la Faculté de Pharmacie. Les germes sont cultivés sur gélose nutritive à 37° pendant vingt-quatre heures, puis mis en suspension dans du tampon phosphate monopotassique-disodique M/15 de pH 6,7. La concentration de cette suspension est ajustée au photomètre de telle sorte qu'elle contient 3 milliards de germes par millilitre (diluée au 1/10 elle titre 10 unités optiques au photomètre Jouan, longueur d'onde 640 m $\mu$ ).

Nous avons essayé outre *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* et *Staphylococcus aureus*, mais la première espèce bactérienne a donné des résultats plus constants (Fricker [8]).

Les sérums des malades ainsi que les sérums de sujets sains sont utilisés soit non décomplémentés, soit chauffés à 56° pendant dix minutes (temps largement suffisant pour détruire toute activité complémentaire quand le volume de sérum à décomplémenter est faible).

Le rôle du complément dans le pouvoir bactéricide des sérums est connu et nous en préciserons plus loin l'importance. Nous avons utilisé une dose standard de complément fourni par du sérum de cobaye (sérum conservé à — 20°). Le sérum de cobaye n'a aucune action bactéricide vis-à-vis d'*Escherichia coli*, ce qui permet son emploi. La dose de complément est de 100 à 125 unités « hémolyse à 50 p. 100 ». La richesse en complément des sérums de cobaye est déterminée par notre technique cinétique. La définition de l'unité complémentaire est la suivante : c'est la plus petite quantité de sérum qui hémolyse en trente minutes 50 p. 100 d'hématies hypersensibilisées, la quantité d'hématies étant aussi faible que possible, et le volume final de la réaction étant ramené à 1 ml.

L'appareil de Warburg utilisé est celui des établissements Braun équipé de fioles coniques jaugées (capacité de l'ordre de 15 ml). Les mesures respirométriques sont faites à 37°. Dans le puits central de chaque fiole on place 0,2 ml de potasse à 10 g p. 100. Dans le réservoir principal est versée la suspension bactérienne additionnée du sérum à tester et de glucose (concentration finale de 2 p. 100). Enfin dans le réservoir latéral, on place 100 unités de complément sous un volume de 0,5 ml en solution tampon phosphate.

*Etude des facteurs intervenant dans la détermination de la mesure de l'activité bactéricide des sérums.*

Nous envisagerons successivement l'action d'un sérum normal frais et chauffé sur l'activité respiratoire d'*E. coli*, le rôle joué par la quantité de sérum mise en jeu, le rôle joué par la quantité de complément ajoutée dans la réaction, et enfin l'action du vieillissement des sérums sur leur pouvoir bactéricide.

1° *Action des sérums normaux chauffés ou non.* — Les résultats sont donnés dans la figure 1. La quantité de sérum est égale à 0,5 ml. On place dans le réservoir principal la suspension bac-

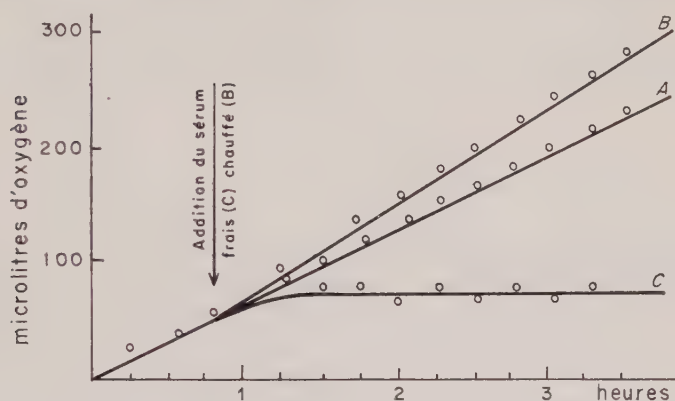


FIG. 1. — Courbe A : respiration normale d'*E. coli*. Courbe B : l'addition de sérum chauffé (0,5 ml) active la respiration. Courbe C : l'addition de sérum frais (0,5 ml) bloque la respiration.

térienne et le tampon glucosé. Dans le réservoir latéral se trouve soit 0,5 ml de sérum humain frais (contenant 225 unités complémentaires), soit 0,5 ml du même sérum décomplémenté, soit 0,5 ml de tampon phosphate. Le contenu des réservoirs latéraux est ajouté à la quarante-cinquième minute. Pendant cette première période, de zéro à quarante-cinq minutes, les courbes respirométriques sont superposables. Après addition de sérum chauffé on constate immédiatement une augmentation de la consommation d'oxygène ; le sérum chauffé apporte donc soit des substances énergétiques nouvelles, soit des activateurs du métabolisme bactérien. L'addition du sérum frais se traduit par les phases suivantes : dans le premier quart d'heure qui suit l'addition de sérum

frais la respiration bactérienne reste active, parfois plus forte que dans les tubes témoins. Puis de la quinzième à la trentième minute, la courbe s'infléchit. Après la trentième minute, la respiration est arrêtée, la courbe est une droite parallèle à l'axe des temps. Le blocage de la respiration d'*E. coli* par le sérum frais n'est donc pas immédiat. Cette observation est en faveur d'une action de type immunologique. Le complément sérique est indispensable à la manifestation de l'activité anti-métabolique des sérums. A ce facteur thermolabile s'ajoutent vraisemblablement d'autres facteurs thermolabiles comme nous le verrons plus loin.

2° *Détermination de la quantité optima de sérum.* — Les protocoles d'expériences sont les suivants. A des quantités décroissantes de sérum (frais ou chauffé) ramenées au volume standard de 0,5 ml avec du tampon phosphate M/15, on ajoute 0,5 ml de suspension bactérienne. Après quinze minutes de contact on ajoute à chaque tube 1 ml de tampon glucosé à 4 p. 100 et 0,1 ml

TABLEAU I.

QUANTITÉ DE SÉRUM EN MICROLITRES	SÉRUM FRAIS		SÉRUM CHAUFFÉ	
	Consommation d'O <sub>2</sub> en 3 h	— QO <sub>2</sub> calculé	Consommation d'O <sub>2</sub> en 3 h	— QO <sub>2</sub> calculé
0	144	380	144	380
0,3	150	380	140	380
1,5	102	275	148	380
6	70	200	110	290
12	58	160	83	225
25	33	80	82	225
50	25	64	49	135
100	32	50	22	60
200	33	30	31	30
400	45	25	47	25

de sérum frais de cobaye (soit 100 unités complémentaires). Dans ce mélange, dont le volume est de 2,1 ml, on prélève une quantité de 1,5 ml qui est introduite dans la fiole de Warburg. Les lectures manométriques commencent dès que l'équilibre thermique est atteint (tableau I).

Les valeurs QO<sub>2</sub> sont calculées après obtention de droites régulières sur les graphiques. En effet, quand le volume de sérum présent dans la fiole est supérieur à 60 microlitres, on observe



une augmentation de la respiration pendant les quinze premières minutes. L'action bactéricide des sérums n'est totale qu'après trente minutes d'observation (fig. 2).

Les résultats précédents montrent que les quantités minima actives sont égales à 0,05 ml si on emploie un sérum non chauffé et à 0,1 ml si on emploie un sérum chauffé, ces quantités étant actives vis-à-vis de 1 milliard de corps bactériens environ dans les conditions expérimentales qui ont été précisées. Au-dessous de ces valeurs, l'activité bactéricide des sérums est fonction de la quantité de sérum. Un sérum normal non chauffé est encore actif à la dose de 1,5 microlitre ; le même sérum chauffé n'est

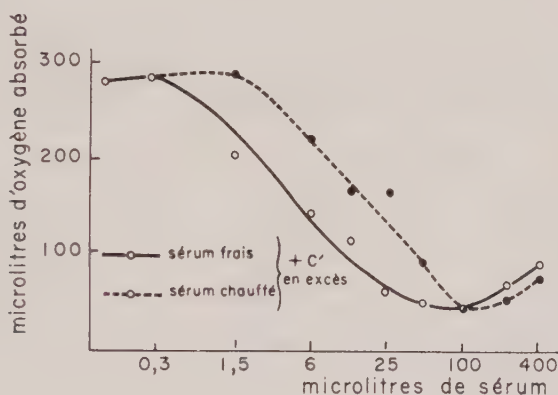


FIG. 2. — En présence d'un excès de complément, un sérum humain normal est actif contre  $10^9$  colibacilles à la dose de 0,05 ml s'il n'est pas décomplémenté, à la dose de 0,1 ml si le sérum a été chauffé à  $56^\circ$  (les abscisses sont données en ordonnées logarithmiques).

plus actif à cette dose, mais est légèrement actif à la dose de 6 microlitres.

La différence notée entre l'action des sérums frais et celle des mêmes sérums chauffés ne s'explique pas par le complément apporté avec le sérum frais. En effet, toutes les fioles ont reçu 0,1 ml de sérum de cobaye, soit 100 unités de complément. On se trouve donc dans tous les cas en excès de complément. En outre, la teneur en complément des sérums humains est de 400 à 500 unités/ml, les doses complémentaires apportées par quelques microlitres de sérum sont faibles par rapport à la dose de 100 unités apportée par le sérum de cobaye.

Au-dessus de 0,1 ml de sérum (frais ou chauffé), on note une activation de l'intensité respiratoire en début d'expérience ; par

la suite, le blocage du métabolisme sera quasi total (pente des courbes voisine de zéro). Ces quantités de sérum sont importantes et permettent mal la comparaison d'activités de divers sérums. C'est pourquoi nous avons choisi, pour les expériences de dosage du pouvoir bactéricide, des doses de 0,05 ml ou 0,1 ml par fiole et pour 1 milliard de bactéries environ en présence d'une addition fixe de 100 unités de complément.

3° Action bactéricide des sérums et rôle du complément sérique.

— Les remarques suivantes résument nos observations :

a) Les sérums chauffés n'ont aucune action anti-métabolique vis-à-vis de la respiration d'*E. coli*. Bien au contraire, nous avons souligné que des doses de sérum chauffé de l'ordre de 0,2 ml (pour 1,5 ml de volume total) activent la consommation d'oxygène.

b) Le sérum frais de cobaye est par lui-même complètement dénué d'action bactéricide vis-à-vis d'*E. coli*, ou du moins il

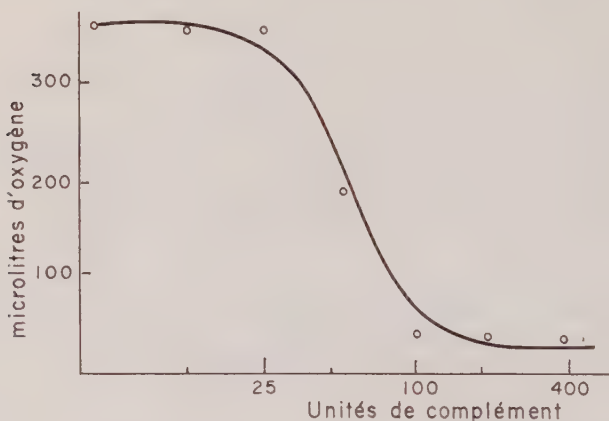


FIG. 3. — Détermination des quantités de complément nécessaires à la réactivation du pouvoir bactéricide des sérums décomplémentés (ordonnées en échelle logarithmique).

n'influence pas la respiration des germes. Si la dose de sérum de cobaye est supérieure à 0,2 ml, ce sérum frais active le métabolisme respiratoire des bactéries.

c) Le sérum frais de cobaye, ajouté au sérum humain chauffé, restaure l'activité du sérum humain.

d) Détermination de la dose de complément nécessaire et suffisante pour restaurer l'activité bactéricide d'un sérum humain

chauffé. Dans des tubes à hémolyse contenant 0,25 ml de sérum humain décomplémenté, 0,25 ml de tampon phosphate et 0,5 ml de suspension bactérienne (1,5 milliard) on ajoute 1 ml de tampon phosphate glucosé contenant des quantités décroissantes de sérum frais de cobaye (de 500 unités complémentaires à 0 unité). Des mélanges réalisés, on prélève 1,5 ml pour en mesurer l'activité respiratoire (fig. 3 et tableau II).

La dose nécessaire et suffisante est donc de 120 unités. Au-dessus de cette dose l'action anti-métabolique n'est pas augmentée. Au-dessous de 30 unités, l'action complémentaire est insuffisante.

TABLEAU II.

QUANTITÉ DE SÉRUM DE COBAYE (en ml)	NOMBRE D'UNITÉS DE COMPLÉMENT	VALEUR DE — QO <sub>2</sub>
0,	0	380
0,012	15	380
0,025	30	380
0,050	60	190
0,100	120	35
0,200	240	30
0,400	480	35

4° *Pouvoir bactéricide et vieillissement des sérums.* — Les sérums humains et animaux sont conservés à — 20° après que les études systématiques ont été pratiquées (fiche réticulo-endothéliale, dosage des lipo-globulines, dosage du complément, études immunologiques). Ce sont les sérums conservés qui sont employés dans les recherches spécialisées. La conservation des sérums à — 20° entraîne peu de modifications dans les propriétés physiques, chimiques ou biologiques des sérums. On note seulement une disparition de l'activité complémentaire en deux mois environ et une grande labilité des liaisons unissant lipides et globulines.

Nous avons dosé le pouvoir bactéricide chez un sujet sain avec cinq échantillons de sérums, conservés respectivement un jour, un mois, sept mois, douze mois et dix-sept mois à la température de — 20°. Les cinq échantillons ont été utilisés sans chauffage préalable : dans les cinq dosages le pouvoir bactéricide a été total. Par conséquent, la conservation des sérums à — 20° est sans action sur le pouvoir bactéricide si on prend soin d'ajouter du complément de cobaye.

*Protocole expérimental type.*

Les expériences précédentes nous ont conduits à adopter le protocole expérimental suivant.

Dans un tube à hémolyse, on introduit successivement 0,5 ml de suspension bactérienne (soit 1,5 milliard ou 0,3 mg de poids sec environ), puis 0,45 ml de solution tampon phosphate M/15 de pH 6,7 et 0,066 ml de sérum à éprouver. A près un temps de contact de trente minutes à la température ordinaire, on ajoute dans le tube à hémolyse 1 ml de solution tampon glucosée à 4 g p. 100. On mélange soigneusement le contenu du tube et on prélève 1,5 ml pour introduire cette quantité dans le réservoir principal de la fiole de Warburg. le puits central contenant déjà la potasse et la tubulure latérale contenant 100 unités de complément. Par série expérimentale, on prépare ainsi 11 fioles avec 11 sérums différents, ou 11 préparations sériques différentes. Deux autres fioles reçoivent uniquement la suspension bactérienne et le tampon glucosé, elles servent de témoin. Les fioles sont fixées aux manomètres. Une quatorzième fiole reste vide et sert de thermobaromètre. Après obtention de l'équilibre thermique, les robinets sont fermés. Les mesures sont faites de quinze en quinze minutes. A la quarante-cinquième minute, on verse le complément dans le réservoir principal. On poursuit les lectures manométriques durant trois heures. Les chiffres obtenus sont corrigés en les multipliant par les constantes de fioles calculées à l'aide d'une abaque. On dresse alors les courbes de microlitres d'oxygène absorbé en fonction du temps. A partir de ces courbes, on calcule les valeurs de  $Q_{O_2}$  dans les intervalles de temps déterminés. Pour la commodité de l'exposé des résultats nous désignerons le pouvoir bactéricide par un pourcentage ; soit A la consommation d'oxygène des fioles témoins (bactéries en milieu tamponné glucosé et en présence de sérum de cobaye), B la consommation d'oxygène de ces mêmes bactéries en présence du sérum à étudier,

le coefficient bactéricide sera égal à  $100 \times \frac{(A - B)}{B}$ .

En ajoutant le complément seulement quarante-cinq minutes après le début de l'expérience, on se réserve la possibilité de juger d'une action bactéricide non immunologique telle que la présence de substances antibiotiques dans le sérum des malades.

Les avantages de cette méthode par rapport aux méthodes bactériologiques classiques sont les suivantes : moindre cause d'erreur dans les prélèvements (emploi de volumes fixes et non de dilutions), possibilité de travailler non stérilement puisque

la durée de l'expérience est de trois heures, mesures contrôlées (les points relevés de quart d'heure en quart d'heure, sont situés sur une même droite), utilisation d'un nombre important de germes (1 milliard).

## DEUXIÈME PARTIE

### ETUDE DU POUVOIR BACTÉRICIDE DE 130 SÉRUMS HYPER- $\gamma$ -GLOBULINIQUES.

Parmi les 250 sérums que nous avons étudiés à l'aide de la technique précédemment décrite, les résultats les plus intéressants sont ceux qui concernent certains sérums humains hyper- $\gamma$ -globuliniques. Nous limiterons à l'exposé de ces résultats les données fournies par nos recherches sur le pouvoir bactéricide des sérums humains.

#### *Origine des sérums.*

La plupart des sérums sont ceux des malades hospitalisés dans le service du professeur Aron (69 cas de cirrhose, 7 cas de macroglobulinémie, 3 cas de  $\gamma$ -myélome). Les sérums de sujets atteints d'hépatite virale proviennent soit de l'hôpital militaire de Tours, soit de l'hôpital militaire de Marseille (sérums qui nous sont adressés par le professeur Charmot). Les sérums d'hyper- $\gamma$ -euglobulinémie essentielle et de macroglobulinémie tropicale proviennent de Madagascar et nous sont envoyés par le D<sup>r</sup> Fouchet.

La teneur des sérums en  $\gamma$ -globulines est établie par calcul (protéïnémie x taux des  $\gamma$ -globulines électrophorétiques). Le dosage de la fraction euglobulinique de ces  $\gamma$ -globulines est obtenu lors de l'établissement de la fiche réticulo-endothéliale (taux de protéines qui précipitent à pH 7,4). Le dosage du complément est déterminé par mesure cinétique et exprimé en nombre d'unités d'hémolyse à 50 p. 100 par ml de sérum.

L'ultracentrifugation des sérums est faite au Centre d'Ultracentrifugation du C. N. R. S. Les taux de macroglobulines dans les sérums des malades macroglobulinémiques se situent entre 10 et 31 p. 100 (les vitesses de sédimentation des fractions macroglobuliniques étant : S3 compris entre 12,5 et 15,7 ; S4 supérieur à 20 U. S.).

#### *Macroglobulinémies.*

Le pouvoir bactéricide a été étudié avec 17 sérums provenant de 12 malades atteints de macroglobulinémie. Dans 7 cas, il s'agissait de maladies de Waldenstrom plus ou moins typiques (cas européens) ; dans 5 cas, il s'agissait de sujets africains



présentant le syndrome « splénomégalie-macroglobulinémie » décrit par Charmot [4] (tableau III).

Par conséquent, il y a absence de pouvoir bactéricide dans 7 cas (cette absence de pouvoir bactéricide ayant été constatée à deux ou trois reprises chez 4 malades). Dans trois autres cas, le pouvoir bactéricide est faible. Il est normal (90 p. 100) chez 2 malades pour lesquels la présence de macroglobulinémie a été une découverte de laboratoire.

TABLEAU III.

	NUMÉROS DES SÉRUMS	MACROGLOBULINES (p. 100)	γ-GLOBULINES TOTALES (en g/l)	γ-EUGLOBULINES (en g/l)	TAUX DE COMPLÉMENT (unités 50 p. 100)	POUVOIR BACTÉRICIDE (p. 100)
<i>A. — Maladie de Waldenstrom.</i>						
Chi... ....	3 513	17	46	26	400	0
	3 624		43	23	550	0
	3 641		45	25	525	0
Oud... ....	2 608	30	58	32		0
Rab... ....	2 705	18	36	7		0
	3 307		40	8	550	0
Bocq... ....	3 226	10	24	4		90
Mim... ....	2 645	23	47	5		0
Cal... ....	3 015	16	29	9		90
Biq., ....	3 569		78	32		0
	3 610		80	35	350	0
<i>B. — Maladie de Charmot.</i>						
Ana... ....	2 639	31	38	10		0
	2 752	15	30	5		0
Vel... ....	1 550	15	37	8		0
J. B... ....	2 314	10	36	6		10
Mam... ....	2 682	13	32	4		30
Kat... ....	3 268	14	46	10		30

### *Gamma-myélomes.*

Trois sérums seulement ont été étudiés. Chez deux malades, le pouvoir bactéricide a été nul. L'un de ces malades avait un taux de γ-euglobulines extrêmement bas (0,1 g par litre) alors

que les  $\gamma$ -globulines totales représentaient 50 p. 100 des protéines sériques. Le deuxième sujet avait un sérum contenant par litre 46 g de  $\gamma$ -globulines dont 16 g de  $\gamma$ -euglobulines. Dans le troisième cas, le pouvoir bactéricide était presque normal (80 p. 100). Le taux des  $\gamma$ -globulines atteignait 63 g. Le sérum formait une gelée dès que la température s'abaissait au-dessous de 30° ; la teneur en complément était augmentée à 800 unités par ml.

### *Cirrhose du foie.*

69 cas de cirrhoses hépatiques d'origine éthylique, méta-ictérique ou nutritionnelle ont été étudiés. Les valeurs du pouvoir bactéricide (P. B.) se répartissent ainsi :

P. B. supérieur à 75 p. 100 .....	27 cas
P. B. compris entre 50 et 75 p. 100 .....	11 cas
P. B. compris entre 25 et 50 p. 100 .....	18 cas
P. B. inférieur à 25 p. 100 .....	13 cas

Par conséquent dans 1 cas de cirrhose sur 5 le pouvoir bactéricide du sérum est très faible. Nous l'avons trouvé nul dans 3 sérums. En comparant les valeurs du pouvoir bactéricide soit avec la protéinémie totale, soit avec le taux des diverses globulines, on ne trouve pas de relation nette. Par ailleurs, nous avons fréquemment constaté chez les cirrhotiques des diminutions du taux de complément, ce taux pouvant s'abaisser à 25 p. 100 du taux normal [135 à 150 unités chez certains cirrhotiques au lieu de 500 unités chez les témoins] (Vargues et coll. [15]).

TABLEAU IV.

TITRE DU COMPLÉMENT	NOMBRE DE SÉRUMS
Entre 500 et 400 U .....	26 cas
Entre 400 et 300 U .....	30 cas
Entre 300 et 200 U .....	11 cas
Au-dessous de 100 U .....	2 cas

Il n'y a cependant pas de concordance obligatoire entre un faible taux de complément et une faible valeur du pouvoir bactéricide. Rappelons, en outre, que les mesures du pouvoir bactéricide se font en présence d'un excès de complément de cobaye.

Enfin nous signalerons que, même avec les sérums qui bloquent totalement la respiration des germes, le blocage de cette activité respiratoire s'effectue lentement : alors que les sérums témoins

agissent après addition du complément en arrêtant la respiration en vingt à trente minutes, les sérums de cirrhotiques interviennent plus lentement, le blocage de l'absorption d'O<sub>2</sub> demande soixante minutes environ pour devenir total.

### *Hépatites infectieuses.*

Le sérum des hépatites virales est caractérisé par une protéinémie supérieure à la normale (80 à 90 g par litre), par une augmentation des  $\beta$ -lipo-globulines et surtout par une hyper- $\gamma$ -globulinémie particulièrement nette sur les F. R. E. Cette hyper- $\gamma$ -globulinémie régresse lentement en deux mois environ après le début de l'ictère (Aron et coll. [1]).

Les sérums de sujets atteints d'hépatites infectieuses proviennent surtout de militaires contaminés en Algérie. 18 sérums seulement ont été étudiés :

P. B. normal .....	12 cas
P. B. compris entre 50 et 75 p. 100 .....	5 cas
P. B. égal à 25 p. 100 .....	1 cas

Ces chiffres sont très voisins de ceux donnés statistiquement par les sujets sains.

### *Dysprotéinémie « africaine »*

Nous groupons sous ce chapitre les résultats observés dans l'étude de 28 sérums provenant de sujets malgaches porteurs de splénomégalie sans macroglobulinémie. Le taux relatif des  $\gamma$ -globulines est compris entre 30 et 55 p. 100, le taux des  $\gamma$ -euglobulines, toujours élevé, est compris entre 2 g/l et 12 g/l ; 13 de ces sérums sont cryo-héماغlutinants. Nous n'avons pu doser le complément de ces sérums (en raison de la durée du transport), mais lors d'une enquête précédente, nous avons trouvé chez des malades identiques des taux de complément soit normaux, soit un peu abaissés (Bergot et coll. [2]).

Les dosages ont montré que 3 de ces sérums étaient dépourvus de P. B. Dans 10 autres cas, le P. B. était voisin de 50 p. 100 et dans 10 cas, il était normal ou proche de la normale.

### *Analyse des facteurs pouvant affecter le pouvoir bactéricide des sérums étudiés.*

Parmi les nombreux facteurs sériques qui peuvent agir sur le métabolisme bactérien, nous avons étudié plus particulièrement les quatre points suivants : rôle du complément, du pouvoir anti-complémentaire, des préparations  $\gamma$ -globuliniques et du lysozyme.

1° *Rôle du complément et du pouvoir anticomplémentaire.* —

Les sérums hyper- $\gamma$ -globuliniques, en particulier les sérums de cirrhotiques, sont parfois pauvres en complément sérique ; d'autre part, leur pouvoir anticomplémentaire est élevé. Puisque le pouvoir bactéricide d'un sérum ne peut se manifester sans l'action du complément, il faut envisager ce facteur « complément » en premier lieu. L'hypo-alexinémie des sérums de cirrhotiques n'est pas en relation avec l'augmentation des  $\gamma$ -globulines (ce qui serait paradoxal), mais avec l'importante baisse des  $\alpha$ -globulines. De façon très générale d'ailleurs, le taux du complément des sérums humains est en relation étroite avec les taux des  $\alpha$ -globulines (dans le sérum humain, le composant C'2 qui est limitant, est de nature  $\alpha$ -globulinique). Mais cette baisse du complément des sérums de cirrhotiques ne se retrouve ni dans les cas de maladie de Waldenstrom, ni dans les cas de myélome, ni chez les malades atteints d'hépatite infectieuse. En outre, les dosages du pouvoir bactéricide sont effectués après addition de 100 unités de complément provenant de sérum de cobaye, ce qui est largement suffisant puisque la quantité nécessaire pour une action bactéricide totale est de 60 unités.

Le pouvoir anticomplémentaire des sérums hyper- $\gamma$ -globuliniques est important. Il est fonction de la quantité de  $\gamma$ -globulines peu solubles présente dans ces sérums (Vargues et Orio [42]). Cette propriété se manifeste mieux à 20° qu'à 37°, et mieux à pH 6 qu'à pH 7. Elle est enfin fonction de la concentration sérique, et diminue dès que la concentration sérique est inférieure à 1/20. Or, le sérum se trouve dilué au 1/30 dans nos mesures. Cependant, afin d'éliminer une action neutralisante des  $\gamma$ -globulines sur le complément de cobaye, nous avons mélangé dans la même fiole 0,05 ml de sérum d'un sujet normal + 0,05 ml d'un sérum d'hyper- $\gamma$ -globulinique dénué de pouvoir bactéricide, les autres facteurs de la réaction demeurant constants (1 milliard de colibacilles, 2 p. 1 000 de glucose, 100 unités de complément, le tout en tampon phosphate sous un volume final de 2 ml). Dans ces essais, nous avons toujours noté un blocage de l'activité respiratoire des germes ; les sérums d'hyper- $\gamma$ -globuliniques ne gênent en rien l'action bactéricide des sérums normaux et par conséquent ne modifient pas l'action du complément de cobaye (fig. 4).

2° *Rôle des  $\gamma$ -globulines des sérums normaux dans le P. B.* —

Nous avons utilisé des sérums normaux à pouvoir bactéricide élevé. A 3 ml de sérum, on ajoute 3 ml d'eau distillée et 3 ml de sulfate d'ammonium 4 M. Le précipité est recueilli par centrifugation. Le surnageant est conservé, dialysé pour le priver du sulfate et ramené à l'isotonie sous un volume de 12 ml final

(sérum privé des  $\gamma$ -globulines et dilué au 1/4). Le culot globulinique est redissous avec 3 ml d'eau distillée et reprécipité à 33 p. 100 de saturation en  $\text{SO}_4 \text{Am}_2$  comme précédemment. Les

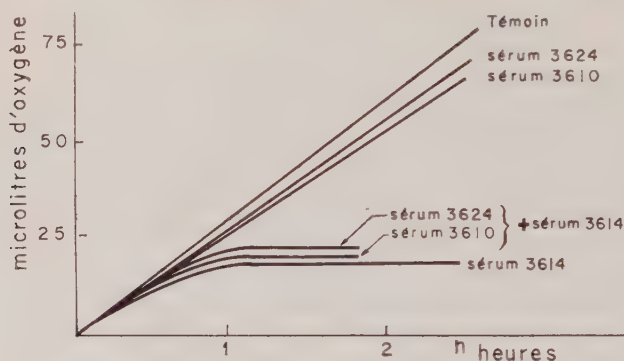


FIG. 4. — Les sérums 3610 et 3624 n'inhibent pas la respiration d'*E. coli*, alors que le sérum 3614 a un pouvoir bactéricide élevé. Ce sérum 3614 garde son activité en présence des sérums 3610 et 3624.

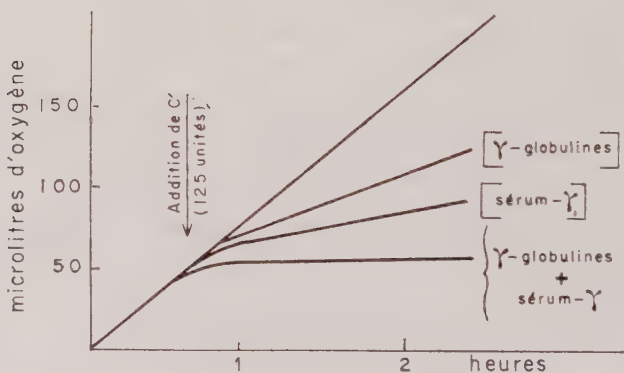


FIG. 5. — Action des  $\gamma$ -globulines d'un sérum normal sur la respiration d'*E. coli* en présence d'un excès de complément.

$\gamma$ -globulines ainsi purifiées, redissoutes dans l'eau (3 ml) sont mises à dialyser, puis ramenées à l'isotonie sous un volume final de 6 ml ( $\gamma$ -globulines du sérum diluées au 1/2). Les contrôles électrophorétiques montrent que les deux préparations ( $\gamma$ -globulines et sérum privé des  $\gamma$ -globulines) correspondent à leur dénomination.

On utilise ces préparations comme on le fait des sérums en



utilisant des quantités équivalentes à celles des sérums (0,1 ml de la solution  $\gamma$ -globulinique et 0,2 ml de la solution « sérum privé des  $\gamma$ -globulines », ou un mélange de ces deux quantités, ce qui correspond à la reconstitution de 0,05 ml du sérum original). En plus de ces quantités nous avons été amenés à doubler et à quadrupler ces doses. Les autres facteurs du dosage demeurent constants (fig. 5).

En utilisant les préparations aux concentrations correspondant à celles des sérums, on constate qu'aucune des deux fractions n'a un P. B. équivalent à celui du sérum total, chaque fraction est active, mais à un degré moindre. Le mélange des deux fractions rétablit le P. B. dans son intégrité. Si on double ou quadruple les doses des préparations, on constate que le P. B. réside surtout dans la fraction privée de  $\gamma$ -globulines.

3<sup>e</sup> *Lysozyme et pouvoir bactéricide*. — Le lysozyme est sans action sur les bacilles Gram — et sur les Entérobactéries en particulier, c'est-à-dire qu'il est incapable de provoquer seul la lyse de ces bactéries. Nous avons contrôlé son inactivité sur le métabolisme respiratoire. Nous avons utilisé une préparation de lysozyme qui s'est révélée active sur *Bacillus megaterium* à la dose de 0,2 mg (pour 4 ml de suspension bactérienne). Des doses de 0,50 mg et 0,25 mg de lysozyme n'ont pas modifié le métabolisme respiratoire des suspensions d'*E. coli*. Rappelons que dans le sérum normal le lysozyme se trouve au taux de 10  $\mu$ g par ml. Dans nos dosages de P. B. qui portent sur 0,05 ml de sérum, c'est donc seulement 0,5  $\mu$ g qui pourrait agir. Or, nos essais montrent que des doses 1 000 fois plus fortes sont sans action. Par conséquent, le P. B. que nous dosons n'est pas dû à la richesse sérique en lysozyme.

#### DISCUSSION.

Les expériences précédentes posent le problème de la nature des substances bactéricides du sérum et celui de l'effet des hyper- $\gamma$ -globulinémies sur le pouvoir bactéricide.

##### *La nature des bactéricidines sériques.*

Sous le nom imprécis de bactéricidines on désigne les protéines sériques qui agissent sur les bactéries soit en les lysant, soit en détruisant leur vitalité en tout ou en partie. De nombreux auteurs ont essayé de préciser et d'identifier certaines bactéricidines. Il faut distinguer deux sortes de substances, les unes classiques, et de grande importance, les autres moins bien connues (Delau-nay [5]).

Les substances bactéricides classiques sont dans l'ordre chronologique : l'alexine ou complément (Buchner-Bordet), les bac-

tériolysines (Pfeiffer-Bordet) et le lysozyme (Fleming). D'autres substances bactéricides sériques ont été décrites parce que les trois éléments précédents ne semblent pas résumer tout le pouvoir bactéricide des sérums. On a donc décrit des plakines sécrétées par les plaquettes (Gruber 1906), des leukines sécrétées par les globules blancs (Schneider 1909) etc. En 1924, Petterson oppose la  $\beta$ -lysine, relativement stable, au complément qu'il nomme  $\alpha$ -lysine. Plus récemment, en 1955 Pillemer décrit le facteur détruisant C'3 en présence de zymosan (properdine); en 1957, Landy étudie le « composant qui détruit l'endotoxine » des Entérobactéries (EDC); en 1958, Wedgwood [16] distingue un facteur bactéricide qui est moins instable dans le plasma que dans le sérum; en 1960, Colobert [4] attribue la transformation d'Entérobactéries en protoplastes à une substance sérique appelée obsistine.

Nous avons vu que nos dosages font intervenir le complément qui est indispensable, mais aussi des facteurs thermostables qui sont sans doute à rapprocher des bactériolysines naturelles ou acquises. C'1 est une  $\gamma$ -euglobuline, C'2 une  $\alpha$ -globuline, C'3 et C'4 sont moins bien définis chimiquement. Les bactériolysines sont des anticorps classiques de nature  $\gamma$ -globulinique. Quant au lysozyme, c'est une protéine bien définie chimiquement et isolée à l'état pur. En raison de leur nature chimique, on peut penser que toute modification de l'équilibre chimique des sérums peut modifier quantitativement ou qualitativement l'activité de ces facteurs. Il en est bien ainsi pour le complément qui, chez l'homme, suit assez exactement le taux des  $\alpha$ -globulines. Quant aux bactériolysines, elles peuvent suivre la même évolution que les autres  $\gamma$ -globulines, c'est-à-dire être sécrétées en plus ou moins grande abondance selon les stimulations du système globulino-formateur.

Les autres facteurs bactéricides décrits sont insuffisamment connus pour savoir à quel titre ils peuvent participer au blocage de l'activité respiratoire d'*E. coli*. Les études les plus précises concernent la properdine, mais les contradictions sont encore nombreuses à son sujet et pour notre part, nous avons toujours échoué dans nos essais de dosage en utilisant la technique d'hémolyse décrite par Pillemer.

### *Hyper- $\gamma$ -globulinémies et pouvoir bactéricide.*

Nous signalerons d'abord que nous avons surtout recherché les diminutions du pouvoir bactéricide et que nous n'avons pas encore essayé de doser les augmentations de cette propriété. Or, sur 130 sérums hyper- $\gamma$ -globuliniques nous notons 57 sérums à pouvoir bactéricide très abaissé.

1° Il n'y a pas de relation entre le taux des  $\gamma$ -globulines sériques et le pouvoir bactéricide des sérums : l'hyper- $\gamma$ -globulinémie

des hépatites virales s'accompagne d'un pouvoir bactéricide normal, alors que le pouvoir bactéricide est bas dans 20 p. 100 des cas de cirrhose hépatique.

2° Corollairement, l'hyper- $\gamma$ -globulinémie ne peut être directement la cause d'un abaissement du P. B. Même dans les cas de macroglobulinémie, nous avons montré que le sérum macroglobulinique n'inhibe pas l'action bactéricide d'un sérum normal.

3° On doit donc admettre que, dans les cas étudiés, il y a concomitance entre l'hyper- $\gamma$ -globulinémie et le faible taux du pouvoir bactéricide. Par conséquent, on peut ajouter nos observations à celles qui démontrent que de nombreuses hyper- $\gamma$ -globulinémies sont dues à des  $\gamma$ -globulines anormales dites paraprotéines.

4° Nous ne pouvons discuter la question de savoir si les observations faites *in vitro* sur le faible pouvoir bactéricide des sérums étudiés représentent la raison de la sensibilité de ces malades aux infections. Les dosages du pouvoir bactéricide posent le même problème que ceux du taux complémentaire des sérums : si Pillemer a cru pouvoir appuyer le rôle bactéricide de la properdine sur les différentes sensibilités des espèces animales aux infections expérimentales, personne n'a trouvé de semblable corrélation en étudiant le taux de complément ou le pouvoir bactéricide. A l'intérieur d'une même espèce animale, chez l'homme en particulier, la pauvreté d'un sérum en complément ou en bactéricidines se trouve surtout dans les maladies graves ; seul fait qui peut être avancé en faveur de leur rôle dans la défense de l'organisme contre l'infection.

#### CONCLUSIONS.

Le pouvoir bactéricide des sérums est aisément mesuré en étudiant l'action de ces sérums, chauffés ou non, sur l'activité respiratoire des bactéries telles que *Escherichia coli*. Le complément sérique est indispensable pour obtenir le blocage de la respiration bactérienne : le sérum de cobaye, dépourvu par lui-même d'action anti-bactérienne, fournit une source commode de complément. En présence de doses fixes de complément, l'action des sérums est fonction de la quantité de sérum utilisée. Des quantités de 0,05 ml à 0,1 ml sont optima pour bloquer en trente minutes la respiration de 1 milliard de colibacilles. Les sérums chauffés à 56° sont un peu moins actifs (en présence d'un excès de complément) que les sérums frais.

Parmi 250 sérums humains étudiés, 130 correspondent à des sérums hyper- $\gamma$ -globuliniques. Des baisses importantes du pouvoir bactéricide sont rencontrées dans les dysprotéinémies importantes

(macroglobulinémies, maladie de Kahler) et dans 20 p. 100 des cas de cirrhose hépatique. Dans les hépatites infectieuses ou les cas de dysprotéinémies communes de l'Africain, le pouvoir bactéricide a des valeurs semblables à celles trouvées chez les sujets sains.

La baisse du pouvoir bactéricide de certains sérums hyper- $\gamma$ -globuliniques n'est en relation ni avec le taux des  $\gamma$ -globulines, ni avec celui du complément sérique. Elle n'est pas due au pouvoir anticomplémentaire des  $\gamma$ -globulines.

## SUMMARY.

### ASSAY OF BACTERICIDAL ACTIVITY OF SERA BY MEANS OF THE EVALUATION OF BACTERIAL RESPIRATION.

#### APPLICATION TO THE STUDY OF HYPER- $\gamma$ -GLOBULINIC SERA.

The bactericidal activity of sera is easily evaluated by the study of the action of these sera (heated or not) on the respiration of bacteria such as *E. coli*. Serum complement is absolutely necessary to inhibit the bacterial respiration : guinea-pig serum, which is deprived of any bactericidal activity, is a good source of complement. In presence of constant amounts of complement, there is a direct relationship between the activity of the sera and the amount of serum used. The optimal amount to inhibit in thirty minutes the respiration of one milliard *E. coli* is 0,05 to 1 ml. Heated sera (65°) are somewhat less active (in presence of complement excess) than fresh sera.

One hundred and thirty hyper- $\gamma$ -globulinic sera were studied. Significant decrease of the bactericidal activity was observed in marked dysproteinemia (macroglobulinemia, Kahler's disease) and in 20 % of the cases of hepatic cirrhosis. In infectious hepatitis and in cases of common dysproteinemia in Africans the bactericidal activity is about the same in hyper- $\gamma$ -globulinic and normal sera.

There is no relationship between the decrease of bactericidal activity of certain hyper- $\gamma$  globulinic sera and the titer of  $\gamma$ -globulins or the titer of complement. This decrease is not due to the anti-complementary activity of  $\gamma$ -globulins.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] ARON (E.), VARGUES (R.) et GROUSSIN (P.). *Rev. méd. Tours*, 1960, 1, 95.
- [2] BERGOT (J.), CHARMOT (G.), DEPOUX (R.), ORIO (J.), RAVISSE (P.) REYNAUX (R.) et VARGUES (R.). *Semaine des Hôp. (Path. et Biol.)*, 1958, 34, 1893.

- [3] CHARMOT (G.) et REYNAUD (R.). *Rev. méd. de Tours*, 1960, **1**, 607.
  - [4] COLOBERT (L.) et KIRN (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **99**, 69.
  - [5] DELAUNAY (A.). *Aux frontières de la microbiologie* (2<sup>e</sup> cahier), Paris, Flammarion, 1959.
  - [6] DESPAUX (E.). *Thèse Médecine*, Alger, 1957.
  - [7] FISCHER (G.). *Acta path. microb. scand.*, 1936, **13**, 190.
  - [8] FRICKER (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1949, **229**, 1029.
  - [9] JEANNENEY (G.), CASTANET (P.) et CATOR (G.). *Presse méd.*, 1938, **46**, 1305.
  - [10] LAMBIN (S.), GERMAN (A.), CARRÈRE (C.) et BERNARD (J.). *Ann. pharmaceut. franç.*, 1957, **15**, 273.
  - [11] MUSCHEL (L. H.). *J. Immunol.*, 1956, **76**, 1.
  - [12] VARGUES (R.) et ORIO (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 537.
  - [13] VARGUES (R.) et GRENIER (B.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **98**, 728.
  - [14] VARGUES (R.). *Rev. méd. Tours*, 1960, **1**, 35.
  - [15] VARGUES (R.), GRENIER (B.) et MORAUD (B.). *Rev. méd. Tours*, 1961, **2**, 70.
  - [16] WEDGWOOD (R. I.). *VII<sup>e</sup> Congrès intern. Microbiol.*, 1958, 190.
-



## LES GROUPES SANGUINS DES CHIMPANZÉS

par A. EYQUEM (\*).

(Institut Pasteur,  
Centre d'Etude des Groupes Sanguins des Animaux,  
Laboratoire d'Hématologie et des Groupes Sanguins)

Le chimpanzé a été l'objet de nombreuses études qui ont fait conclure que 90 p. 100 d'entre eux appartiennent au groupe A et que 10 p. 100 appartiennent au groupe O [3, 5, 12, 13, 14]. Jusqu'à maintenant on n'a jamais rencontré de chimpanzés du groupe B.

Néanmoins, ces conclusions ne doivent pas être considérées comme définitives, car les chimpanzés ne forment pas une race unique et on doit distinguer quatre races géographiques de l'ouest à l'est de l'Afrique : *Pan troglodytes verus* de Schwarz occupe la Haute-Guinée, alors que *Pan troglodytes troglodytes* occupe la Basse-Guinée. Un groupe séparé, *Pan troglodytes schweinfurthi*, occupe l'Oubangui jusqu'au Lac Victoria, tandis que *Pan troglodytes paniscus*, plus rare, se rencontre sur la rive gauche du Congo.

Comme le montre l'étude d'André et coll. [4] la proportion d'individus O varie avec le groupe géographique et peut atteindre 36 p. 100 chez certaines races de *Pan troglodytes* de Manbasa (pour 158 individus examinés), alors qu'elle était de 10 p. 100 pour l'ensemble des animaux examinés antérieurement : elle est de 2/17 pour *Pan paniscus*.

### MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Les échantillons de sang que nous avons examinés provenaient d'animaux qui avaient été recueillis par l'Institut Pasteur de Kindia (Guinée, Dr M. Lefrou). Ces échantillons de sang ont été, dans certains cas, prélevés par M. Lefrou à Kindia et expédiés par avion en ampoules scellées, et dans d'autres cas, prélevés sur les animaux en captivité à la singerie de l'Institut Pasteur de Paris.

Ces échantillons ont été examinés le plus rapidement possible après leur prélèvement, la résistance érythrocytaire semblant inférieure à

(\*) Société Française de Microbiologie séance du 2 mars 1961.

celle observée dans l'espèce humaine. Les différents examens ayant été réalisés sur une assez longue période (entre 1953 et 1956 surtout), il n'a pas toujours été possible d'utiliser les mêmes antisérums. Ceux-ci étaient essentiellement des iso-immunsérums d'origine humaine. Les antigènes érythrocytaires ont été recherchés par agglutination directe, par absorption en eau physiologique ou en albumine, en tube ou sur plaque, ou encore à l'aide de la réaction indirecte de Coombs. L'agglutination directe a été utilisée dans certains cas douteux pour examiner l'activité d'une solution purifiée d'agglutinines, obtenue par élution à partir de globules rouges humains. Certains résultats préliminaires sont peut-être à réviser, notamment dans la détermination des antigènes du système Rh, car ils n'ont pas fait intervenir l'emploi de globules rouges trypsinés ou papainés qui s'est révélé particulièrement favorable à la mise en évidence des antigènes D et c du système Rh.

#### LES ANTIGÈNES A ET B.

Au cours de l'examen de deux grandes séries de chimpanzés totalisant 39 animaux, nous n'avons trouvé aucun animal du groupe B. Tous les animaux examinés appartenaient au groupe A. Tous, sauf un, possédaient un antigène A ayant un caractère voisin de l'antigène humain  $A_1$ , alors qu'un seul avait un antigène voisin de l'antigène humain  $A_2$ .

Dans le sérum de tous les individus existait une agglutinine active sur les globules rouges humains B ; le plus souvent, il n'existe pas dans le sérum de ces chimpanzés d'agglutinine active sur les globules rouges humains du groupe O ; lorsqu'elle existe, elle n'a qu'un faible titre, le plus souvent inférieur à 1/10. Par contre, dans le sérum humain on trouve souvent une agglutinine anti-chimpanzé d'un titre de 1/64 ou 1/128.

#### SYSTÈME Rh.

Les antigènes du système Rh semblent avoir fourni aux différents auteurs des résultats discordants ; ceci peut être attribué à l'inégale sensibilité des diverses techniques, ainsi qu'à l'utilisation de sérums de faible titre.

Dans une première série de 10 animaux examinés en 1950, nous avons observé que tous possédaient l'antigène c et qu'un seul possédait l'antigène D, en étudiant le pouvoir d'absorption des culots globulaires pour les antigènes érythrocytaires. Aucun des animaux examinés ne possédait les antigènes C et E.

Les 13 animaux d'une deuxième série possédaient tous l'antigène c, et 8 possédaient l'antigène D, alors que 3 présentaient une faible absorption pour le sérum anti-c, n'ayant pas de valeur significative. Une dernière série de 16 animaux a été étudiée comparativement par absorption des anticorps et après traitement des

globules rouges par la papaine. Nous avons noté en 1951 que les globules rouges papainés de chimpanzés présentaient vis-à-vis de certains immunosérums une agglutinabilité plus grande que les globules rouges normaux. Cette technique nous a révélé l'existence de l'antigène D sur les globules rouges de tous les animaux de cette série. L'examen comparatif de globules rouges humains et des globules rouges de chimpanzé a montré que le titre agglutinant du sérum anti-D était de 1 3200 après une heure au bain-marie à 37°, aussi bien vis-à-vis de globules rouges humains que vis-à-vis de globules rouges de chimpanzé, sauf pour un seul animal où il était plus faible.

L'antigène c est révélabl par la même technique. Pour tous les animaux, sauf un, l'agglutinabilité donnait un titre de 1/200 égal à celui observé avec les globules rouges humains hétérozygotes CDe/cde. Pour un seul animal le titre était de 1/24.

Aucun des animaux examinés ne possédait l'antigène E, sauf un seul, dont les globules rouges révélaient un titre de 1/50 à l'aide d'un sérum anti-E titrant 1/200 vis-à-vis de globules rouges humains. Chez aucun animal les globules rouges n'étaient agglutinables par le sérum anti-e.

L'antigène C était décelable après papainisation des globules rouges jusqu'à un titre de 1/50 chez 6 animaux.

Aucun ne possédait l'antigène C<sup>w</sup>.

Ces résultats sont à comparer avec ceux des auteurs précédents [8, 10, 12, 13, 14].

Wiener [14] a noté la présence de l'antigène Rh<sub>0</sub> chez les 14 chimpanzés examinés à l'aide de sérum humain anti-Rh<sub>0</sub>. Tous les animaux possédaient l'antigène c (hr') ; chez aucun d'entre eux il n'a trouvé les antigènes C (rh'), E (rh''), e (hr'').

Un chimpanzé examiné par Race et Sanger possédait l'antigène c et ne possédait pas les antigènes C, E et e. Les globules rouges de cet animal absorbaient l'agglutinine anti-D de certains sérums, semblant ainsi posséder un antigène du type D<sup>u</sup>. Un autre chimpanzé examiné par Ikin et Mourant possédait l'antigène c en plus d'un antigène de type D<sup>a</sup> et peut-être un antigène e [10].

#### LES ANTIGÈNES M ET N.

Les 13 animaux de la deuxième série examinée possédaient un antigène M, décelable par absorption ou agglutination directe avec les sérums de lapin anti-M ou d'iso-sérum humain anti-M. Aucun ne possédait l'antigène N.

Parmi les 10 animaux de la première série, 6 avaient un antigène M facilement décelable, mais pour 4 d'entre eux l'antigène M n'était pas évident. Ce fait a déjà été noté par Wiener qui

a observé que les globules rouges de certains chimpanzés n'étaient pas agglutinables par certains sérums anti-M. Un chimpanzé examiné par Mourant ne possédait que l'antigène M, de même que celui étudié par Race et Sanger.

Quatorze chimpanzés examinés par Wiener [14] sont considérés comme possédant à la fois les antigènes M et N, mais les facteurs sont probablement différents de ceux existant chez l'homme. Les globules rouges de 7 de ces chimpanzés étaient agglutinables par l'extrait de *Vicia graminea*.

Parmi les 13 chimpanzés étudiés par Levine [9], 4 avaient des globules rouges agglutinables par *Vicia graminea*. Les globules rouges absorbaient la lectine de la même manière que les globules rouges humains MN ou N.

Dix-sept chimpanzés ont été examinés par Butts [2] et tous réagissaient avec le sérum anti-M et un avec le sérum de lapin anti-N.

Les antigènes S et P n'ont pas été décelés ; par contre, l'antigène K et Fy<sub>a</sub> ont été mis en évidence chez quelques animaux.

Le chimpanzé examiné par Ikin et Mourant [10] ne possédait pas les antigènes S, P, Lu<sup>a</sup>, Le<sup>a</sup> et Le<sup>b</sup>.

L'antigène Lu<sup>a</sup> n'a pas été décelé à l'examen de 20 individus.

#### ETUDE DU SÉRUM.

Dans le sérum de ces chimpanzés, il existe parfois une faible agglutinine hétéro-spécifique anti-homme titrant 1/2 ou 1/4, ainsi qu'une agglutinine anti-B titrant 1/16 à 1/128.

L'étude du groupe sérique Gm<sup>a</sup> de 27 chimpanzés nous a montré, avec M<sup>me</sup> Podliachouk [11], la présence du facteur Gm (a +) analogue à celui connu dans le sérum humain. Cette mise en évidence est facile après absorption des hétéro-agglutinines. La concentration semble cependant plus faible que celle existant dans le sérum d'homme Gm (a +). Nous n'avons pas constaté de variations dans la teneur en facteur Gm<sup>a</sup> chez les animaux au cours de prélèvements successifs. Par contre, le facteur Gm<sup>a</sup> n'était pas décelable dans le sérum de 17 cynocéphales examinés.

#### PRÉPARATION D'UN SÉRUM DE CHIMPANZÉ ANTI-HOMME.

Un chimpanzé femelle (Negritta) a été immunisé par injections successives de sang humain provenant d'un donneur O, M, N, S, R<sub>1</sub> R<sub>2</sub>, Fy (a +), Lu (a —) et Kell<sup>+</sup>. Dans le sérum de ce chimpanzé nous avons vu se développer une agglutinine anti-homme, dont le titre était compris entre 1/800 et 1/3 200 lorsqu'on l'évaluait vis-à-vis des globules rouges de différents donneurs à antigènes



érythrocytaires connus. L'absorption sélective de cette agglutinine à l'aide de culots globulaires de ces différents donneurs de race blanche n'a pas permis d'isoler d'agglutinine spécifique d'un antigène érythrocytaire.

Un antigène commun aux chimpanzés et au sang humain provenant de sujets de races blanche ou noire a été signalé par Butts [2] après préparation d'un sérum de lapin anti-chimpanzé.

Au cours de cette immunisation le chimpanzé a été inoculé avec du sang prélevé lorsque le donneur était en incubation d'hépatite virale. Le chimpanzé a présenté une hépatite avec ictère dans les sept semaines qui ont suivi la dernière injection pratiquée avant l'apparition de signes cliniques chez le donneur [6].

Il est à noter que la transmission de l'hépatite à virus a été tentée par divers auteurs. Jusqu'à maintenant elle n'avait pas abouti à un passage à l'animal, soit en utilisant des extraits de fèces, soit d'organes d'individus atteints d'hépatite depuis plusieurs jours (Evans [4]).

#### RÉSUMÉ.

Les 39 chimpanzés examinés possèdent l'antigène A. Les antigènes Rh D et c sont très aisément décelables après papainisation des globules rouges.

Il n'y a aucun signe évident de la présence des antigènes E, c et C<sup>w</sup>.

L'antigène C serait, peut-être, possédé à faible dose, par quelques-uns des animaux.

L'antigène M est aisément décelé chez tous les individus dont le sang est fraîchement prélevé.

Les antigènes N, S, P, Lu<sup>a</sup> ne sont pas évidents.

Certains animaux semblent posséder les antigènes K et Fy<sup>a</sup>.

#### SUMMARY

##### BLOOD-GROUPS IN CHIMPANZEES.

The 39 chimpanzees studied possess the A antigen. The Rh D and c antigens are very easily demonstrable after treatment of red cells by papain.

There is no evidence of the presence of E and C<sup>w</sup> antigens.

The C antigen might be present at low concentrations, in some animals.

The M antigen is easily demonstrated in any chimpanzee on fresh blood samples.

There is no evidence of the presence of N, S, P, Lu<sup>a</sup> antigens.

Certain chimpanzees seem to possess the K and Fy<sup>a</sup> antigens.



★  
★★

Cette étude a été réalisée avec la collaboration technique de M<sup>lles</sup> J. Robin, Y. Crépin et J. D. de Saint-Martin.

|★★

Nous remercions les professeurs J. J. van Loghem et A. E. Mourant de nous avoir fourni certains des antisérums utilisés dans cette étude.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] ANDRÉ (A.), COURTOIS (G.), LENNES (G.), NINANE (G.) et OSTER-RIETH (P. M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, **101**, 82-95.
- [2] BUTTS (D. C. A.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1953, **83**, 701-705.
- [3] DUJARRIC DE LA RIVIÈRE (R.) et EYQUEM (A.). *Les groupes sanguins chez les animaux*. Editions Méd., Flammarion, 1953.
- [4] EVANS (A. S.). *Nation Acad. Sci. U. S. A.*, publication 322, p. 558.
- [5] EYQUEM (A.). *Bull. Centr. Lab. Bloodtransfusiedienst-Med. Rode-Kruis* 1952, **2**, 202-207.
- [6] EYQUEM (A.). *Congrès Soc. europ. Hématol.*, Freiburg, 1955.
- [7] EYQUEM (A.) et FINE (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 92-96.
- [8] FURUHATA (T.) et UETAKE. *Proceed. Jap. Acad.*, 1954, **30**, 674-676.
- [9] LEVINE (P.), OTTENSOOSER (F.), CELANO (M.) and POLLITZER (W.). *Amer. J. Phys. and Anthropol. N. S.*, 1955, **13**, 29.
- [10] MOURANT (A. E.). *The distribution of the human blood groups*. Blackwell Scientific Publications, Oxford 1954.
- [11] PODLIACHOUK (L.) et EYQUEM (A.). *VII<sup>e</sup> Congrès Soc. intern. Trans. sanguine*, Rome, Karger, édit., 1959.
- [12] WIENER (A. S.). *Amer. J. Phys. Anthropol. N. S.*, 1952, **10**, 1-4.
- [13] WIENER (A. S.), GAVAN (J. A.) and GORDON (E. R.). *Amer. J. Phys. Anthropol.*, 1953, **11**, 39-45.
- [14] WIENER (A. S.). *Blood*, 1960, **16**, 1357-1359.

## MISE EN ÉVIDENCE D'ANTIGÈNES DE GROUPES SANGUINS A, B, O ET Rh CHEZ LES SINGES CHIMPANZÉS (\*)

par A. ANDRÉ (\*\*), G. COURTOIS (\*\*\*), G. LENNES (\*\*),  
G. NINANE (\*\*\*) et P. M. OSTERRIETH (\*\*\*).

Dès la découverte des groupes sanguins chez l'homme, quelques chercheurs ont tenté de mettre en évidence des antigènes analogues chez les animaux.

Dès 1911, on étudia particulièrement le sang de certains singes anthropomorphes, notamment les chimpanzés. On a pu ainsi mettre en évidence des antigènes et divers anticorps analogues à ceux des sangs humains. Landsteiner et Miller [6]; Landsteiner et Lévine [5]; Troisier; Weinert; Voronoff; Alexandresco et Medecin; M<sup>me</sup> Judina; Dahr P.; Candela cités par: R. Dujarric de la Rivière et A. Eyquem [2], Wiener [9], Mourant [7], Eyquem et Fine [4], Wiener [10].

Ces recherches se font par absorption de sérums humains contenant les anticorps anti-A et anti-B.

L'ensemble des résultats a montré que pour chaque série de chimpanzés on observait la présence de l'agglutinogène A seul dans 90 p. 100 des sangs et l'absence des agglutinogènes A et B dans 10 p. 100 des cas; ceux-ci étaient rangés comme appartenant au groupe O. Dans aucun sang examiné on n'a pu mettre en évidence la présence d'agglutinogène B.

Dans le groupe A, il y aurait une différenciation en sous-groupes A<sub>1</sub> et A<sub>2</sub>, ainsi qu'il existe chez l'homme (Dahr cité par Eyquem et Dujarric de la Rivière [2], Ikin et Mourant [7]).

La présence d'autres antigènes tels que les antigènes M, N, et les sous-groupes du facteur Rhésus: C, D, E, c, d, e, est discutée.

La mise en évidence de ces antigènes se fait, comme pour les antigènes A et B, par absorption des anticorps correspondants dans les sérums humains ou animaux.

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 2 mars 1961.

(\*\*) Laboratoire Universitaire des Groupes Sanguins, Université de Liège (Directeur: Professeur P. MOUREAU).

(\*\*\*) Laboratoire Médical Provincial, Stanleyville (Congo Belge, avant le 30 juin 1960).

En ce qui concerne l'antigène D, il a été mis en évidence par des méthodes d'absorption (Eyquem [3]), ou par des méthodes d'agglutination, les hématies étant au préalable traitées par la papaine ou la trypsine (Eyquem), la ficine (Wiener, Gavan et Gordon cités par Mourant [7]). Ikin et Mourant [7], à la suite d'essais d'absorption assimilent ce caractère D au Du humain.

Le pourcentage d'échantillons de sang ayant donné lieu à une absorption varie d'ailleurs d'un auteur à l'autre.

Les facteurs C et E n'ont pu être retrouvés (Wiener et Wade ; Wiener, Gavan et Gordon, cités par Mourant [7], Mourant et Race [8]).

L'antigène c a été mis en évidence par absorption dans quelques échantillons isolés (Wiener et Wade [41], Eyquem [3], Race et Sanger, Ikin et Mourant, cités par Mourant [7]), et par agglutination d'hématies traitées par la papaine (Eyquem [3]), par la ficine (Wiener, Gavan et Gordon, cités par Mourant [7]).

#### MATÉRIEL ET TECHNIQUE.

Nous avons eu, à notre tour, l'occasion d'entreprendre de semblables recherches grâce à la collaboration des D<sup>rs</sup> Courtois, Ninane et Osterrieth, du Laboratoire Médical Provincial à Stanleyville (Congo Belge), qui nous ont adressé 175 échantillons de sang de singes chimpanzés, dont 158 *Pan troglodytes* et 17 *Pan paniscus*.

Pour nos études nous avons utilisé, comme les autres auteurs, des méthodes d'absorption.

Certaines de nos analyses ont été faites à partir d'hémolysats de sangs de chimpanzés ; en effet, ces sangs nous parvinrent d'abord fortement hémolysés en raison des conditions de transport. Celles-ci ayant été améliorées par la suite, nous avons alors reçu des échantillons de sangs citratés qui nous ont permis de travailler à partir de culots d'hématies bien conservées.

A notre tour, nous avons cherché à mettre en évidence dans les sangs de chimpanzés les agglutinogènes A et B, et dans le sérum les anticorps anti-A et anti-B.

#### *Technique de mise en évidence des agglutinogènes A et B.*

On utilise des sérums anti-A et anti-B à taux d'activité connus vis-à-vis d'hématies A et B (1). Ces sérums sont mis en contact douze heures à 4°, à l'aide de pipettes graduées et à raison de 1 volume pour 1 volume soit de sang hémolysé, soit de culot globulaire concentré dont les hématies ont été préalablement lavées. Le sérum ainsi absorbé est centrifugé, et le surnageant est titré à nouveau ; la centrifugation est inutile lorsqu'il s'agit de sang hémolysé.

Nous avons considéré qu'une différence d'au moins 3 dilutions permet de conclure à la présence ou à l'absence de l'agglutinogène recherché.

(1) Les sérums utilisés étaient les mêmes pour l'étude de chaque série ; les hématies étaient également de même origine.

*Technique de mise en évidence des anticorps anti-A et anti-B.*

Afin d'éliminer la présence d'une agglutinine naturelle anti-humaine dans ces sérums, on a procédé comme suit :

1° Chaque échantillon a été divisé en quatre parties que l'on absorbe isolément, et à volume égal, par des globules O, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> et B.

2° Chacun des échantillons ainsi absorbé est titré à nouveau vis-à-vis de globules O, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> et B.

## RÉSULTATS.

Nos résultats sont donnés dans les tableaux I et II.

L'examen du tableau I indique que 101 échantillons éprouvés, soit 63,9 p. 100, contiennent l'agglutinogène A et non l'aggluti-

TABLEAU I. — Recherche des agglutinogènes A et B.

	NOMBRE D'ÉCHANTILLONS ÉPROUVÉS	TYPE A nombre d'échantillons ayant donné lieu à absorption d'un sérum anti-A	TYPE B nombre d'échantillons ayant donné lieu à absorption d'un sérum anti-B	TYPE O nombre d'échantillons n'ayant pas donné lieu à absorption d'un sérum anti-A et d'un sérum anti-B
<i>Pan troglodytes</i> ...	158	101	0	57
<i>Pan paniscus</i> .....	17	15	0	2
Totaux .....	175	116	0	59

TABLEAU II. — Recherche des anticorps anti-A et anti-B dans 26 échantillons de sérum.

NOMBRE D'ÉCHANTILLONS : 26	AGGLUTINATION HÉMATIES B	AGGLUTINATION HÉMATIES A
Groupe A .....	20	0
Groupe O .....	6	0

nogène B. Ils peuvent donc être rangés comme appartenant au groupe A. Par contre, 57, soit 36,1 p. 100, ne possédant ni l'agglutinogène A ni l'agglutinogène B peuvent être considérés comme du groupe O. Aucun n'a donné lieu à l'absorption du sérum anti-B.

Par l'étude du tableau II, on constate donc que les singes du groupe A, c'est-à-dire possédant l'agglutinogène A, ont dans leur sérum une agglutinine anti-B, les singes du groupe O ayant des agglutinines anti-A et anti-B.

Ces derniers résultats confirment d'ailleurs ceux obtenus par Eyquem et Fine [4] et Maurant et Ikin [7].

Devant la proportion de groupe A et O différente de celle trouvée par les autres auteurs, tout au moins en ce qui concerne les *Pan troglodytes*, nous avons cherché à connaître la raison de cette différence.

Nous nous sommes demandé si l'étude faite pour certains sangs

TABLEAU III. — Répartition des groupes A et O dans les séries traitées à partir d'hémolysats et de sangs frais.

	GROUPE A			GROUPE O		
		hémolysat	sang frais		hémolysat	sang frais
Ango (45 échantillons)						
Nombre d'échantillons .....	19	9	10	26	11	15
Pourcentage ....	42,2%	37,5%	47,5%	57,7%	52,1%	62,5%
$\chi^2 = 0,470$						
Banalia (38 échantillons)						
Nombre d'échantillons .....	27	14	13	11	5	6
Pourcentage ....	70,9%	73,6%	68,4%	28,9%	26,3%	31,6%
$\chi^2 = 0,159$						

à partir d'hémolysats et pour d'autres sangs à partir de suspensions globulaires fraîches n'était pas à l'origine de ces divergences.

Mais, parmi nos chimpanzés *Pan troglodytes*, deux séries connues sous le nom de *Banalia* et d'*Ango* (leur lieu de capture) sont constituées de mêmes types d'échantillons éprouvés par ces deux méthodes : hémolysat et sang frais.

Les résultats sont donnés dans le tableau III.

L'étude statistique de ces résultats montre que ceux-ci ne sont pas significativement différents, et que les proportions de sangs de groupe O et de groupe A sont superposables quand les



recherches sont faites à partir d'hémolysats ou à partir de suspensions globulaires fraîches.

Pour la série de singes *Ango* on trouve :

$$\chi^2 = 0,470$$

soit pour 1 degré de liberté, une probabilité de :

$$0,3 < P < 0,5.$$

De même, pour la série *Banalia* :

$$\chi^2 = 0,154$$

soit pour 1 degré de liberté, une probabilité de :

$$0,5 < P < 0,7.$$

Ainsi nous voyons que, dans chacun des groupes examinés, *Ango* ou *Banalia*, la répartition des sangs de type A ou O est pratiquement la même, que ces sangs soient examinés à partir de sangs hémolysés ou à partir de sangs frais.

Nous ne nous sommes pas bornés à cette seule étude statistique des deux méthodes ; en effet, l'expérience suivante a été réalisée. La série des Mambasa (*Pan troglodytes*) a d'abord été étudiée à partir de sangs frais ; une seconde étude a été faite en laissant hémolyser ces sangs dans des conditions à peu près identiques à celles réalisées lors des premiers essais, c'est-à-dire, des variations marquées de température et un séjour prolongé dans une atmosphère surchauffée.

Les résultats des deux groupes de recherches ont été absolument superposables et sont indiqués dans le tableau IV.

Nous nous sommes également demandé si ces différences ne provenaient pas, en réalité d'une grande diversité de races de chimpanzés *Pan troglodytes* ; en effet, ces animaux étaient groupés au

TABLEAU IV.

MAMBASA (21 échantillons)	GROUPE A	GROUPE O
Hémolysats .....	19 (90,4 %)	2 (9,6 %)
Sangs frais .....	19 (90,4 %)	2 (9,6 %)

Laboratoire de Stanleyville et étudiés sans que l'on se soucie de leurs lieux de capture, parfois très éloignés l'un de l'autre. Comme il est peut-être très important pour nous de connaître ces lieux de capture, nous avons groupé les chimpanzés d'après leur provenance ; ce classement est donné dans le tableau V où chaque série porte le nom de la région d'origine.

Nous avons effectué un premier groupement de séries en nous basant sur la proximité des lieux de capture. Nous avons ainsi été amenés à former trois groupes dont l'homogénéité a été examinée :

GRUPE I : Ango et Bondo :  $\chi^2 = 2,271$ , soit pour 1 degré de liberté :  $0,1 < P < 0,2$ .

GRUPE II : Banalia, Wanie Rukula et Bafwasende :  $\chi^2 = 2,427$ , soit pour 2 degrés de liberté :  $0,2 < P < 0,3$ .

GRUPE III : Mambasa.

TABEAU V. — Chimpanzés Pan troglydites.

LIEU DE CAPTURE	NOMBRE TOTAL D'INDIVIDUS ÉPROUVÉS		GRUPE A	GRUPE O
Ango .....	45	Nombre d'échantillons	19	26
		Pourcentage	42,2	57,7
Bondo .....	12	Nombre d'échantillons	8	4
		Pourcentage	66,5	33,4
Banalia .....	38	Nombre d'échantillons	27	11
		Pourcentage	70,9	28,9
Wanie Rukula ....	14	Nombre d'échantillons	12	2
		Pourcentage	85,6	14,4
Bafwasende .....	12	Nombre d'échantillons	7	5
		Pourcentage	58,3	41,7
Mambasa .....	21	Nombre d'échantillons	19	2
		Pourcentage	90,4	9,6
Autres régions ....	16	Nombre d'échantillons	9	7
		Pourcentage	56,2	43,7

Nous avons cherché à voir si nous pouvions réunir trois groupes en un seul ; aussi avons-nous comparé le groupe I au groupe II puis au groupe III. Les résultats du  $\chi^2$  sont les suivants :

GRUPE I-GRUPE II :  $\chi^2 = 7,565$ , soit pour 1 degré de liberté :  $P \leq 0,01$ .

GOUPE I-GROUPE III :  $\chi^2$  (correction de continuité Yate) = 10,072, soit pour 1 degré de liberté :  $P \leq 0,01$ .

Il n'est donc pas possible de réunir le groupe I aux deux autres.

Nous avons procédé de la même façon pour les groupes II et III.

Le  $\chi^2$  est de 3,041, soit pour 1 degré de liberté :  $0,1 < P < 0,5$ .

Il est donc possible de grouper en une seule, pour le système ABO, les séries II et III ; cependant, l'étude ultérieure du facteur Rhésus démontrera que cette association ne peut être envisagée.

Nous allons maintenant comparer chacun des trois groupes aux proportions de groupe A (90 p. 100) et O (10 p. 100) trouvées par les autres auteurs.

Nous avons utilisé la table de Fisher sur la distribution binomiale.

Pour le groupe I, il y a moins de 5 chances sur 1 000 pour que l'on observe 27 ou moins de 27 singes de groupe A sur les 57 échantillons si la fréquence théorique des A est de 0.9. Par conséquent, le groupe I diffère significativement des proportions trouvées par les autres auteurs.

Il en est de même pour le groupe II, où il y a moins de 5 chances sur 1 000 pour que l'on observe 18 singes O sur 64 si la fréquence théorique du groupe O est de 0,1.

Seuls les pourcentages observés chez les Mambasa (groupe III) ne diffèrent pas de ceux rencontrés par les autres auteurs.

### *Répartition des groupes A et O.*

L'étude sérologique de sangs de chimpanzés nous a donné une répartition des groupes A et O différente de celle trouvée par les autres auteurs, tout au moins en ce qui concerne les *Pan troglodytes* ; en effet, les *Pan paniscus* ont une répartition de groupes A (88,2 p. 100) et O (11,8 p. 100) analogue à celle trouvée jusqu'ici.

L'étude statistique de nos résultats nous a montré que l'on pouvait peut-être réunir nos séries en groupes correspondant à une dispersion géographique, donnant ainsi trois ethnies plus ou moins distinctes : deux de celles-ci ont une proportion de type O nettement plus élevée qu'ailleurs, la troisième, donnée sous le nom de Mambasa, ayant une répartition de types A et O analogue à celle des séries étudiées par d'autres.

Chacun de nos groupes était constitué de groupes de quelques singes capturés peut-être au même moment ; on ne doit pas écarter la possibilité d'une répartition différente due à la vie communautaire de ces animaux amenant ainsi la capture simultanée de plusieurs individus d'une même famille.

*Mise en évidence des antigènes A<sub>1</sub> et A<sub>2</sub>.*

Devant la bonne qualité du matériel mis à notre disposition lors des derniers envois de sang, nous avons pensé qu'il était intéressant de rechercher s'il existait parmi le groupe A une différenciation en sous-groupes A<sub>1</sub> et A<sub>2</sub>, d'autant plus que lors de l'absorption des sérums anti-A pour la mise en évidence de l'agglutinogène A dans les sangs de singe, nous avons observé que certains sangs donnaient lieu à une absorption totale de cet anticorps tandis que d'autres ne donnaient lieu qu'à la diminution de trois dilutions du taux d'activité de l'agglutinine anti-A.

C'est pourquoi nous avons repris une série de 40 échantillons pris au hasard, sur lesquels nous avons travaillé à l'aide des méthodes d'absorption d'une part, et des méthodes d'agglutination directe d'autre part.

A l'aide de culots globulaires, nous avons procédé à l'absorption de sérums humains anti-A. Nous avons utilisé des sérums anti-A de personnes B agglutinant encore les hématies A à un taux du 1/128, ainsi que les sérums O anti-A anti-B dont nous connaissions l'activité vis-à-vis de globules A<sub>1</sub> et A<sub>2</sub>.

L'agglutination des globules A<sub>1</sub> se manifeste encore pour ce sérum à une dilution de 1/256, et l'agglutination des globules A<sub>2</sub> se manifeste jusqu'à une dilution de 1/128.

Ces absorptions ont été faites dans les conditions décrites antérieurement.

Nos résultats transcrits dans le tableau VI (première partie) ont été les suivants :

1° Certains sangs (17) ont donné lieu à l'absorption totale de l'anticorps anti-A de sérum B anti-A.

Le sérum O anti-A, titré vis-à-vis de globules A<sub>1</sub>, n'agglutinait plus ceux-ci qu'à une dilution de 1/16 ; titré vis-à-vis de globules A<sub>2</sub> il n'y avait plus d'agglutination.

2° Six échantillons de sang ont donné lieu à une absorption faible de l'anticorps anti-A de sérum B anti-A (1/32). Il y avait également une absorption faible (1/64) de l'anticorps anti-A de sérum O titré vis-à-vis de globules A<sub>1</sub>, mais vis-à-vis de globules A<sub>2</sub> cette absorption était plus marquée (1/8).

3° Enfin, une dernière série (17) n'a donné lieu à l'absorption d'aucun sérum.

Nous avons ensuite procédé à des réactions d'agglutination directe des hématies de singe à l'aide des trois sérums suivants :

Un sérum humain anti-A<sub>1</sub> ayant une agglutinine naturelle anti-singe (chimpanzé) très faible ;

TABLEAU VI. — Mise en évidence des antigènes ABO.

Nombre d'échantillons de sangs de singes	RÉACTION D'ABSORPTION		RÉACTION D'AGGLUTINATION		
	Sérum humain B anti-A absorbé par gl. singe + gl. humains A activité avant absorption 1/128	SÉRUM HUMAIN O anti-A absorbé par gl. singe + gl. hum. A <sub>1</sub> + gl. hum. A <sub>2</sub> activité avant absorption		Sérum humain anti-A <sub>1</sub> + gl. singe	Sérum singe anti-A <sub>1</sub> + gl. singe
		1/256	1/128		
17	0	0	0	++	—
6	1/32	1/64	1/8	+	+
17	1/128	1/256	1/128	+	++

Un sérum de singe (*Cynomolgus philippinensis*) ne possédant pas d'agglutinine naturelle anti-chimpanzé ;

Un extrait d'*Ulex europeus* absorbé par les globules A<sub>1</sub>B et spécifique (anti-O, anti-A<sub>2</sub>), qui ne contient aucune agglutinine anti-chimpanzé.

Les réactions d'agglutination se font par mise en présence de quantités égales de sérum et de suspension globulaire à 5 p. 100. Ces réactions se font en tubes, à 37°, et le temps de contact est de trente minutes. La lecture a lieu après centrifugation.

Les résultats des réactions d'agglutination sont transcrits dans la seconde partie du tableau VI.

1° Les hématies des 17 suspensions globulaires qui avaient donné lieu à une absorption très forte de l'anticorps anti-A de sérums B anti-A, O anti-B anti-A, sont fortement agglutinées par les deux sérums anti-A<sub>1</sub> jusqu'à une dilution du 1/4 et non par les sérums d'*Ulex* anti-A<sub>2</sub> anti-O.

2° Les hématies des 6 suspensions globulaires qui n'ont que fai-



blement absorbé le pouvoir d'agglutination des hématies A de sérum B anti-A, des hématies A<sub>1</sub> d'un sérum O anti-A anti-B, mais ont absorbé plus fortement le pouvoir d'agglutination des hématies A<sub>2</sub> du même sérum O anti-A anti-B, sont faiblement agglutinées par l'anticorps anti-A<sub>1</sub> humain jusqu'à une dilution de 1/2, mais sont agglutinées par des sérums d'*Ulex* anti-O anti-A<sub>2</sub> jusqu'à une dilution de 1/4.

3° Les hématies des 17 suspensions globulaires qui n'ont pas donné lieu à l'absorption de l'anticorps anti-A de sérum B anti-A et O anti-A anti-B sont très faiblement agglutinées par le sérum pur anti-A<sub>1</sub> d'origine humaine, mais sont fortement agglutinées par un sérum anti-O anti-A<sub>2</sub> jusqu'à une dilution du 1/2.

De la comparaison des deux parties du tableau on peut conclure :

Parmi les échantillons classés comme A (24) :

17 (73,9 p. 100) s'apparenteraient à un antigène A fort ;

6 (26 p. 100) s'apparenteraient à un antigène A faible.

Ces recherches nous ont permis de mettre en évidence, parmi les échantillons éprouvés comme appartenant au groupe A, l'existence d'un antigène A très marqué donnant lieu à une absorption totale de l'anticorps anti-A et analogue à l'antigène A<sub>1</sub>. A côté de ceux-ci existent des individus que l'on peut classer comme appartenant au groupe A mais dont le caractère antigénique A moins marqué les apparente plutôt au type A<sub>2</sub>.

#### *Mise en évidence des antigènes D, C, E et c du système Rhésus.*

A partir d'un certain nombre d'échantillons de sang, nous avons tenté, par les mêmes techniques d'absorption, de mettre en évidence les différents antigènes du système Rhésus : D, C, E et c.

Nous avons utilisé des sérums dont les taux d'activité étaient de : anti-D, 1/128 ; anti-C, 1/64 ; anti-E, 1/64 ; anti-c, 1/128.

Les conditions d'absorption et de dosage des sérums étaient les mêmes que celles utilisées pour la mise en évidence des agglutinogènes A et B, mais les réactions tant d'absorption que les dosages par agglutination se font à 37°.

Ici aussi nous n'avons considéré comme positives que les réactions d'absorption donnant lieu à une diminution de 3 dilutions dans le dosage comparatif des taux d'activité des sérums avant et après absorption.

63 échantillons de sang ont été éprouvés vis-à-vis des sérums anti-D, anti-C, anti-E, anti-c ; 32 échantillons ont été éprouvés vis-à-vis du seul sérum anti-c.

Nos résultats sont transcrits dans le tableau VII, où nous avons classé nos échantillons ainsi que nous l'avions fait précédemment, par région géographique.

Nous devons aussi signaler que plusieurs de ces échantillons ont été éprouvés deux ou trois fois avec une concordance parfaite des résultats obtenus.

Enfin, signalons que nous avons éprouvé vis-à-vis des sérums anti-D, anti-C et anti-c les sangs de 16 échantillons pris au hasard parmi les séries étiquetées Banalia et Ango, en traitant les hématies par une enzyme protéolytique, la trypsine, en solution à 1/1 000, suivant la technique décrite par Dausset [1]. Aucun de ces échantillons n'a donné lieu à l'absorption de l'un ou de l'autre de ces sérums malgré l'emploi de la méthode enzymatique.

L'examen du tableau VII montre que, parmi tous nos échantillons testés, seuls ceux de la série Mambasa ont donné lieu à

TABLEAU VII.

	TOTAL DU NOMBRE D'ÉCHANTILLONS ÉPROUVÉS	NOMBRE D'ÉCHANTILLONS POSSÉDANT LES CARACTÈRES				NOMBRE D'ÉCHANTILLONS ÉPROUVÉS POUR LE SEUL CARACTÈRE c	
		D	C	E	c	Nombre d'échantillons	
						évalués	possédant le caractère c
Ango .....	23	0	0	0	0	4	0
Banalia .....	15	0	0	0	0	5	0
Mambasa .....	17	17	12	0	17	—	—
Autres races ...	9	0	0	0	0	2	0
Bondo .....	—	—	—	—	—	5	0
Bafwasende ...	—	—	—	—	—	16	0

l'absorption de sérums anti-D, anti-C ou anti-c, mais aucun (y compris le Mambasa) n'a donné lieu à l'absorption d'un sérum anti-E.

En ce qui concerne la série Mambasa, elle semblerait constituer un groupe bien isolé, sérologiquement et géographiquement. Dans ce groupe, les caractères D et c sont présents chez tous les individus évalués ; 70 p. 100 possèdent le caractère C.

Pour conclure ces recherches sur les antigènes du système

Rh, nous pouvons dire que nous avons isolé parmi les chimpanzés *Pan troglodytes* un groupe d'animaux Mambasa possédant les caractères D, C et c, mais non le caractère E. Les autres groupes examinés ne possédaient aucun de ces caractères.

#### DISCUSSION.

L'ensemble de nos recherches sur les sangs de 175 chimpanzés *Pan troglodytes* et *Pan paniscus* nous a amenés à mettre en évidence une fréquence plus élevée du groupe O que celle qui est donnée habituellement pour les chimpanzés *Pan troglodytes*. En effet, nous en trouvons 36 p. 100 alors que, habituellement, on ne cite que 10 p. 100 de *Pan troglodytes* appartenant au groupe O.

Une étude plus détaillée nous a amenés à les étudier sous l'angle de la répartition géographique, ce qui a permis de les classer en séries où la proportion des groupes A et O variait de l'une à l'autre. L'étude statistique nous a amenés à opérer un regroupement des séries qui coïncidait d'ailleurs avec la répartition géographique.

Parmi ces groupes *Pan troglodytes*, un seul (Mambasa) avait une fréquence de groupes A et O analogue à celle trouvée par les autres auteurs.

En ce qui concerne les *Pan paniscus*, nous trouvons également une fréquence de groupes A et O analogue à celle qui est donnée ailleurs pour les chimpanzés. Notons que la différenciation en *Pan troglodytes* et *Pan paniscus* ne semble pas avoir été faite.

Parmi nos chimpanzés, tant *Pan troglodytes* que *Pan Paniscus*, il ne nous a pas été possible de mettre en évidence l'agglutino-gène B ce qui confirme les résultats trouvés par d'autres.

Nous avons également confirmé l'existence d'anticorps anti-A et anti-B dans les sérums de sangs de chimpanzés de groupe O, tandis que les singes de groupe A ne possédaient que la seule agglutinine anti-B.

L'étude du caractère A nous a permis de dissocier, dans ce groupe, un pourcentage de sangs : 73,9 p. 100 possédant un antigène voisin du caractère A<sub>1</sub>, 26,1 p. 100 possédant un antigène répondant au caractère A<sub>2</sub>.

Par rapport à ceux des autres auteurs, nos résultats sont en concordance pour les caractères D et c que l'on retrouve chez un petit nombre de singes.

Par contre, le caractère E paraît manquer chez les singes, aussi bien d'après les recherches des autres auteurs que d'après nos propres recherches.

Enfin, à notre connaissance, le caractère C que nous avons décelé chez les *Pan troglodytes* Mambasa n'a pu être mis en évidence jusqu'ici (2).

#### CONCLUSIONS.

L'étude de ces séries de chimpanzés *Pan troglodytes* et *Pan paniscus* nous a amenés à considérer que la fréquence des caractères A et O variait très fortement suivant les groupes de singes examinés et était différente de celle donnée habituellement par les autres auteurs. Seuls les *Pan paniscus* et un groupe de chimpanzés *Pan troglodytes* possédaient une répartition analogue à celle trouvée ailleurs.

Dans le groupe A, nous avons pu montrer qu'il existait une différenciation analogue aux sous-groupes A<sub>1</sub> et A<sub>2</sub>.

Les résultats obtenus par l'étude des sous-groupes du facteur Rhésus nous ont amenés à individualiser un groupe géographiquement isolé (Mambasa) qui nous avait été donné comme *Pan troglodytes*.

Ces résultats nous ont amenés à nous demander s'il n'existait pas des singes du groupe *Pan troglodytes* de variétés différentes, tout au moins en ce qui concerne les groupes sanguins. Peut-être pourrait-on les rattacher aux sous-variétés *Pan verus* et *Pan schweinfurtti*, mais il ne nous a pas été possible de confirmer ce dernier point, n'ayant pas obtenu suffisamment de renseignements biologiques.

#### SUMMARY

##### DEMONSTRATION OF ABO AND Rh BLOOD GROUPS ANTIGENS IN CHIMPANZEES.

The study of two groups of chimpanzees (158 blood samples from *Pan troglodytes* and 17 from *Pan paniscus*) showed that the occurrence of A and B properties is markedly variable according to the group studied and is very different from the frequency reported by other workers. Only in *Pan paniscus* and in a group of *Pan troglodytes* the authors found a distribution of the A and B properties analogous to that described by other workers.

In group A, the authors demonstrated the existence of a differentiation corresponding to the A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> subgroups.

The study of the Rh subgroups showed that a series of chimpanzees geographically isolated (Mambasa) and considered as belonging to *Pan troglodytes*, should constitute a special group.

(2) Le Dr Eyquem nous signale avoir mis en évidence le caractère C chez 11 chimpanzés sur 22 étudiés (travail à paraître).

These findings suggest that different varieties might exist in the group *Pan troglodytes*, at least with regard to blood groups; they might be related to the *Pan verus* and *Pan schweinfürti* varieties, but it was not possible to confirm this point, the biological data being insufficient.

★★

Ce travail a été réalisé grâce à l'aide du Fonds National de la Recherche Scientifique.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] DAUSSET (J.). *Immuno-hématologie biologique et clinique*. Editions médicales Flammarion, 1956.
  - [2] DUJARRIC DE LA RIVIÈRE (R.) et EYQUEM (A.). *Les groupes sanguins chez les animaux*. Editions médicales Flammarion, 1953.
  - [3] EYQUEM (A.). *Bull. Centr. Lab. Bloedtransfusiedienst Ned. Rode Kruis*, 1952, **2**, 202-207.
  - [4] EYQUEM (A.) et FINE (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 92-96.
  - [5] LANDSTEINER (K.) and LEVINE (P.). *J. Immunol.*, 1938, **22**, 387-400.
  - [6] LANDSTEINER (K.) and MILLER (C. P.). *J. exp. Med.*, 1925, **42**, 841-852.
  - [7] MOURANT (A. E.). *The distribution of the human blood groups*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1954.
  - [8] MOURANT (A. E.) and RACE (R. R.). *Science*, **104**, 277.
  - [9] WIENER (A. S.). *Blood group and transfusion*, 3<sup>e</sup> édit. Thomas, édit., Springfield, Illinois, 1943, chap. XIX.
  - [10] WIENER (A. S.). *Blood*, 1960, **46**, 1357-1359.
  - [11] WIENER (A. S.) and WADE (M.). *Science*, 1945, **102**, 177.
-



## GROUPES SANGUINS DES PORCS

par A. KACZMAREK (\*), M<sup>me</sup> L. PODLIACHOUK, P. MILLOT  
et A. EYQUEM (\*\*)

[*Centre d'Etude des Groupes Sanguins des Animaux,  
Institut Pasteur, Paris, et C. N. R. Z., Jouy-en-Josas (S.-et-O.)*]

Depuis les premiers travaux de Fischbein (1913), puis de Szymanowski et ses collaborateurs (1926 [28]) qui ont abouti surtout à la reconnaissance de l'antigène A, d'autres auteurs ont mis en évidence différents antigènes dont la correspondance n'a pas toujours été établie dans les différentes nomenclatures. Ainsi, 3 autres agglutinogènes ont été signalés par Eyquem [9]; 4 antigènes ont été aussi observés par Szent-Ivanyi et Szabo (1954 [27]).

C'est par la réalisation d'iso-immunisation qu'on a pu identifier avec le plus de sûreté les différents antigènes érythrocytaires; ceux-ci avaient déjà été pressentis par Kuhns (1950 [19]).

Cette immunisation a été entreprise par E. Andresen au Danemark à partir de 1955 et a abouti à l'isolement de 16 antigènes érythrocytaires appartenant probablement à 9 systèmes des groupes sanguins [1, 2, 3, 4, 5].

Pour chacun des systèmes F, I, J et L il n'y a qu'un seul facteur décelable. Les autres systèmes comprennent deux ou plusieurs facteurs : G et H, deux facteurs; K, 3 facteurs; E, 4 facteurs : Ea, Eb, Ec, Ef.

Le système H est analogue au système Z des bovidés, les globules rouges des sujets homozygotes ayant une réactivité supérieure à celle des hétérozygotes.

Les différents antigènes sont décelables à l'aide d'iso-immunsérums, d'hétéro-immunsérums de lapin anti-globules rouges de porc, soit par hémolyse, soit par agglutination.

L'antigène A est décelable à l'aide de sérum anti-J de bovidés, l'antigène a allémorphe de A, à l'aide d'anticorps anti-r du mouton.

(\*) Boursier des relations culturelles.

(\*\*) Société Française de Microbiologie, séance du 2 mars 1961.

Wroblewski (1957-1959 [29]) a isolé 9 anticorps préparés par iso-hétéro-immunisation ; 4 d'entre eux se sont révélés identiques à certains des anticorps préparés par Andresen.

Kaczmarek (1958-1960 [17]), de son côté, a obtenu par iso-immunisation 8 anticorps dont 6 étaient identiques à ceux de Wroblewski.

Staffier (1958 [25]) a isolé 6 antigènes et Sirbu et Paunescu (1960 [24]) en ont isolé 4, décelables à l'aide d'iso-agglutinines actives en eau physiologique.

Joysey, Goodwin et Coombs (1959 [15]) ont isolé 11 antigènes dont certains décelables à l'aide de globules rouges trypsinés ou de sérum anti-globulinique. La répartition de ces antigènes a été étudiée dans 7 races de porcs [16].

L'étude de ces antigènes érythrocytaires a été complétée par celle de leur transmission héréditaire. Kaempffer (1932 [18]) a observé que l'antigène A dépendait d'un gène dominant. Andresen a fait les mêmes constatations pour les antigènes F, H, I et J. Dans le système E, les antigènes Eae, Ea et Ee constituent trois allèles.

Kaczmarek [17], étudiant 39 familles avec 347 produits, a observé que les 10 facteurs érythrocytaires isolés dépendent de gènes dominants.

Des communautés antigéniques existent entre les facteurs érythrocytaires du porc, d'autres mammifères et de l'homme.

Il existe une relation entre l'antigène humain A et l'antigène porcine A. Cette communauté a été retrouvée avec les antigènes bovin J et ovin R (Podliachouk et Eyquem [20]).

Les antigènes de groupes sanguins extra-érythrocytaires ont été moins étudiés. On sait qu'ils existent dans l'estomac notamment et certaines préparations de pepsine. L'antigène A soluble se retrouve dans le sérum de 70 p. 100 des porcs ayant le groupe sanguin A (Podliachouk et Eyquem [20]), ainsi que dans leur salive (Podliachouk et Wroblewski [21]).

La maladie hémolytique néonatale des porcelets a été observée par de nombreux auteurs [6, 7, 8, 10, 11, 14, 26].

Le rôle de la vaccination contre la peste porcine, notamment à l'aide de vaccin au cristal violet, a été mis en évidence par Goodwin et Ruth Saison [12]. Cette vaccination provoque l'apparition d'iso-anticorps [13]. Ces anticorps gardent un titre très élevé pendant plusieurs années. La maladie apparaît surtout chez les porcelets provenant de croisements d'Essex ou Wessex par Large White.

Il reste néanmoins bien des points obscurs dans le déterminisme de cette maladie hémolytique.

## TECHNIQUES.

*Prélèvement du sang.*

*Contention.* — L'anse d'un nœud coulant est introduite dans la bouche et serre la mâchoire supérieure tandis que l'animal tente généralement de reculer. L'autre extrémité de la corde est alors passée dans un anneau ou simplement par-dessus le muret de séparation du box et maintenue tendue par un aide.

*Petits prélèvements.*

Les prélèvements de quelques millilitres destinés à l'étude des suspensions globulaires sont effectués à la veine de l'oreille au moyen d'une aiguille de 8/10 de millimètre de diamètre et 5 cm de long. Le sang s'égoutte dans un tube contenant de l'eau physiologique citratée à 10 p. 100.

*Prélèvements importants.*

Les prélèvements faits sur les donneurs en vue de l'immunisation ou sur les receveurs en cours d'immunisation sont faits à la veine cave antérieure au moyen d'une aiguille de 1,5 mm de diamètre et de 15 cm de longueur que l'on enfonce au défaut de l'épaule de bas en haut vers l'arrière et légèrement en oblique en direction du plan médian du corps. La technique de ce prélèvement a été précisée par B. L. Dumont, qui préconise le maintien du porc en décubitus dorsal (*An. Zoot.*, 1955, 4, 297).

Les immunsérums ont été récoltés aux abattoirs par saignée totale.

*Préparation des iso-immunsérums.*

Les porcs immunisés sont âgés de plus de 6 mois. On leur injecte une fois par semaine dans la veine de l'oreille 10 ml d'une suspension de globules rouges à 50 p. 100 dans du citrate de soude à 3,2 p. 100. L'anticorps apparaît souvent dès la troisième injection. On fait un prélèvement de contrôle au bout de la quatrième ; dans le cas où le titre est satisfaisant, on fait une saignée huit à dix jours après la dernière injection. Dans le cas contraire, on poursuit l'immunisation. L'activité des anticorps est recherchée par agglutination ou par hémolyse.

*La réaction d'agglutination* est réalisée en tubes à hémolyse : on mélange II gouttes de sérum agglutinant à dilution convenable à I goutte de suspension de globules rouges à 2 p. 100 en eau physiologique. La lecture se fait après deux ou trois heures à la température du laboratoire, à l'aide d'un miroir concave. L'intensité de l'agglutination est notée de 1 à 4 croix. On vérifie l'absence d'agglutination des globules rouges en suspension dans l'eau physiologique.

*La réaction d'hémolyse* est réalisée en présence de sérum frais de lapin, dont les agglutinines hétéro-spécifiques de lapin anti-porc ont

été absorbées à la température du laboratoire pendant trente minutes, en mettant en contact 1 volume de sérum et 1 volume de culot globulaire préalablement lavé quatre fois en eau physiologique. Ce culot globulaire est préparé à partir du sang citraté de plusieurs porcs. Ce complément de lapin peut être conservé à  $-20^{\circ}$  pendant plusieurs semaines, à condition de le décongeler une seule fois avant l'utilisation.

La réaction est réalisée dans des tubes à hémolyse. On dispose successivement II gouttes de sérum, I goutte de suspension de globules rouges à 2 p. 100 ; après quinze minutes de séjour à  $20^{\circ}$  on ajoute I goutte de complément de lapin ; après une soigneuse agitation on dépose les tubes au bain-marie à  $28^{\circ}$  C. On ajoute à chaque série les tubes témoins de la suspension globulaire, du sérum et du complément.

On vérifie l'hémolyse après trente minutes, deux heures et quatre heures. Après chaque lecture on agite régulièrement les tubes. On note l'intensité de l'hémolyse de 1 à 4 croix.

#### RÉSULTATS.

Cette étude a été poursuivie à l'aide de 10 immunsérums permettant de déceler les antigènes érythrocytaires suivants : A, B, C, Ea, Eb, EaEe, F, Ka, X, Y. Tous ces sérums ont été préparés par l'un de nous (Kaczmarek) sauf les sérums anti-B et anti-C, qui nous ont été aimablement fournis par notre collègue et ancien collaborateur A. Wroblewski. Six anticorps ont une spécificité identique à ceux proposés par ce dernier (A, Ea, Eb, EaEe, F, Ka).

Nous avons étudié les antigènes érythrocytaires de 222 porcs de race Large White à laquelle appartiennent la plupart des porcs élevés en France. Nous avons de plus examiné 38 porcs de race Pietrain, race d'origine belge récemment importée en France. Il est à noter que les prélèvements de sang sont particulièrement dangereux chez les animaux de cette race. Dans la même série, nous avons examiné 9 porcs de race danoise. Antérieurement, les mêmes iso-immunsérums ont été utilisés par l'un de nous (Kaczmarek) pour déterminer les groupes sanguins de 100 porcs de race Zlotnicka.

Nous avons ainsi comparé la fréquence des antigènes érythrocytaires dans ces 4 races. Cette fréquence diffère selon la race comme l'indique le tableau I.

La race Large White est caractérisée par la fréquence la plus élevée du facteur A, alors que la race Pietrain présente la plus faible fréquence des facteurs A, C, Ea, Y et une absence complète du facteur F. Sous réserve du petit nombre d'animaux de race danoise examinés, nous pouvons noter la fréquence très élevée de l'antigène F, qui atteint 0,555, alors que dans les autres elle ne dépasse pas 0,13. La race Zlotnicka est caractérisée par la faible fréquence du facteur EaEe (0,51), tandis que dans les autres races sa fréquence est de 0,8 à 0,9.

L'antigène B n'a pas été décelé parmi les animaux examinés. L'immunsérum décelant cet antigène a eu son activité confirmée au cours d'une étude effectuée en Pologne sur des animaux provenant de l'abattoir.

TABLEAU I. — Répartition des antigènes érythrocytaires des porcs dans diverses races.

FACTEUR ÉRYTHRO- CYTAIRE	LARGE WHITE (FRANCE) 222 ANIMAUX FRÉQUENCE	PIETRAIN 38 ANIMAUX FRÉQUENCE	DANOISE 9 ANIMAUX FRÉQUENCE	ZLOTNICKA (POLOGNE) 100 ANIMAUX FRÉQUENCE
A .....	0,374	0,079	0,222	0,180
B .....	0,000	0,000	0,000	0,000
C .....	0,937	0,605	1,000	0,730
Ea .....	0,149	0,079	0,333	0,320
Eb .....	0,820	0,868	0,888	0,960
Ea-Ee .....	0,860	0,816	0,888	0,510
F .....	0,014	0,000	0,555	0,130
Ka .....	0,392	0,395	0,333	0,410
X .....	0,441	0,211	0,444	0,300
Y .....	0,577	0,289	0,555	—

#### ANALYSE STATISTIQUE.

Nous postulons l'hypothèse de l'existence de gènes indépendants les uns des autres dans l'apparition de ces caractères érythrocytaires. L'indépendance des caractères qualitatifs peut être analysée par l'étude statistique à l'aide du test  $\chi^2$ . Si les valeurs de  $\chi^2$  obtenues pour toutes les paires des gènes ne sont pas significatives, on en conclut que le résultat de l'étude mathématique n'est pas en contradiction avec l'hypothèse émise.

Les résultats expérimentaux sont classés par paires. L'antigène B étant absent et le sérum anti-EaEe représentant un mélange de deux anticorps, l'étude statistique a été effectuée pour 8 antigènes érythrocytaires.

Le nombre de combinaisons possibles pour 8 caractères, est de 28, d'après la formule  $\frac{n(n-1)}{2}$ .

Le calcul statistique a été appliqué à la population des porcs Large White dont nous avons examiné 222 individus. Pour les autres races, le nombre d'animaux étudiés était trop faible.

Pour chaque paire d'antigènes nous avons calculé la valeur de



$\chi^2$ . Ces résultats sont présentés dans le tableau II avec les limites de probabilité. Parmi 28 valeurs de  $\chi^2$ , 8 sont significatives.

Ceci peut être attribué à divers facteurs : les tables de trois paires d'antigènes contiennent un petit effectif, nombre relativement limité d'animaux examinés, parenté relative entre les

TABLEAU II.

	FACTEURS	$\chi^2$	PROBABILITÉ
1.....	A et Ka	5,791	0,02 - 0,01
2.....	A et Ea	0,467	0,5 - 0,3
3.....	A et Eb	6,005	0,02 - 0,01
4.....	A et C	0,497	0,5 - 0,3
5.....	A et F	1,124	0,3 - 0,2
6.....	A et X	16,087	< 0,001
7.....	A et Y	131,399	< 0,001
8.....	Ka et Ea	0,128	0,8 - 0,7
9.....	Ka et Eb	23,928	< 0,001
10.....	Ka et C	0,003	1 - 0,9
11.....	Ka et F	0,049	0,9 - 0,8
12.....	Ka et X	0,988	0,5 - 0,3
13.....	Ka et Y	3,623	0,1 - 0,05
14.....	Ea et Eb	0,665	0,5 - 0,3
15.....	Ea et C	0,702	0,5 - 0,3
16.....	Ea et F	0,539	0,5 - 0,3
17.....	Ea et X	38,967	< 0,001
18.....	Ea et Y	0,000	1 - 0,9
19.....	Eb et C	1,130	0,3 - 0,2
20.....	Eb et F	0,666	0,5 - 0,3
21.....	Eb et X	0,532	0,5 - 0,3
22.....	Eb et Y	10,261	0,01 - 0,001
23.....	C et F	0,223	0,7 - 0,5
24.....	C et X	0,153	0,7 - 0,5
25.....	C et Y	1,162	0,3 - 0,2
26.....	F et X	0,138	0,8 - 0,7
27.....	F et Y	2,234	0,2 - 0,1
28.....	X et Y	9,876	0,01 - 0,001

différents animaux, difficulté de détermination de certains caractères par les réactions d'hémolyse.

L'étude plus étendue d'autres groupes de Large White et d'autres races permettra de parvenir à une conclusion qui tire son intérêt de l'importance de la connaissance des groupes sanguins pour préciser le rapport des différentes races entre elles, évaluer le coefficient de consanguinité, vérifier la filiation et les croisements.

## RÉSUMÉ.

Nous avons examiné la répartition des 10 antigènes érythrocytaires porcins dans 4 races (Large White, Pietrain, Danoise et Zlotnicka [Pologne]). Dans la race Large White, le facteur A est le plus fréquent. La race Pietrain présente la plus faible fréquence des facteurs A, C, Ea et Y, et l'absence complète du facteur F. La race Danoise est caractérisée par la fréquence la plus élevée du facteur F. La race Zlotnicka présente la plus faible fréquence des facteurs EaEe.

## SUMMARY.

## BLOOD GROUPS OF SWINE.

Study of the 10 erythrocyte antigens of swine in four races : Large White, Pietrain, Danish and Zlotnicka (Poland).

In the Large White race, the A factor is the most frequent.

In the Pietrain race, the factors A, C, Ea and Y are the less frequent, the F factor fails altogether.

The Danish race is characterized by the highest frequency of the F factor, the Zlotnicka race, by the lowest frequency of the EaEe factor.

★★

Nous sommes redevables à Monsieur Thibault d'avoir mis à notre disposition le troupeau des animaux du Centre National de la Recherche Zootechnique à Jouy-en-Josas.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] ANDRESEN (E.). *Kgl. vet. Landbohøjsk. Fysiol., Endokrinol. Blodtypepef.*, 1957, 1.
- [2] ANDRESEN (E.). *Nord. vet. Med.*, 1957, **9**, 274.
- [3] ANDRESEN (E.) et coll. *Rep. VI<sup>th</sup> internat. Blood group Congress*, Munich, août, 1959, 33.
- [4] ANDRESEN (E.) et IRWIN (M. R.). *Nord. vet. Med.*, 1959, **11**, 540.
- [5] ANDRESEN (E.) et WROBLEWSKI (A.). *Nord. vet. Med.*, 1959, **11**, 548.
- [5 a] ANDRESEN (E.) et IRWIN (M. R.). *Agric. scand.*, 1959, **9**, 3.
- [6] BROWN (R. G.) et DOLL (E. R.). *Cornell Vet.*, 1954, **44**, 86.
- [7] BRUNER (D. W.), BROWN (R. G.), HULL (F. E.) et KINRAID (A.). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1949, **115**, 94.
- [8] BURTON (J. C.) et BROOKSBANK (N. H.). *Vet. Rec.*, 1953, **65**, 287.
- [9] DUJARRIC DE LA RIVIÈRE (R.) et EYQUEM (A.). *Les groupes sanguins chez les animaux*. Flammarion, édit., Paris, 1953.

- [10] GOODWIN (R. F. W.) et COOMBS (R. R. A.). *J. comp. Path.*, 1956, **66**, 317.
  - [11] GOODWIN (R. F. W.), HAYWARD (B. H. G.), HEARD (D. H.) et ROBERTS (G. F.). *Sang*, 1955, **26**, 24.
  - [12] GOODWIN (R. F. W.) et SAISON (R.). *J. comp. Path.*, 1955, **65**, 79.
  - [13] GOODWIN (R. F. W.) et SAISON (R.). *J. comp. Path.*, 1956, **66**, 163.
  - [14] GOODWIN (R. F. W.) et SAISON (R.). *J. comp. Path.*, 1957, **67**, 126.
  - [15] JOYSEY (V. C.), GOODWIN (R. F. W.) et COOMBS (R. R. A.). *J. comp. Path.*, 1959, **69**, 29.
  - [16] JOYSEY (V. C.), GOODWIN (R. F. W.) et COOMBS (R. R. A.). *J. comp. Path.*, 1959, **69**, 292.
  - [17] KACZMAREK (A.). [Résultats non publiés.]
  - [18] KAEMPFER (A.). *Z. Abs. Vererb*, 1932, **61**, 261.
  - [19] KUHN (W. J.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1950, **74**, 685.
  - [20] PODLIACHOUK (L.) et EYQUEM (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 751.
  - [21] PODLIACHOUK (L.) et WROBLEWSKI (A.). *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **244**, 2867.
  - [22] SAISON (R.), GOODWIN (R. F. W.) et COOMBS (R. R. A.). *J. comp. Path.*, 1955, **65**, 71.
  - [23] SAISON (R.). *J. Immunol.*, 1958, **80**, 463.
  - [24] SIRBU (Z.) et PAUNESCU (Gh.). *Lucrarile stiint., Inst. Pat. Ig. anim.*, 1960, **10**, 213.
  - [25] STAFFIER (R.). *Thèse doct.*, Berlin, 1958, n° 2566.
  - [26] SZENT-IVANYI (T.) et SZABO (S.). *Acta. vet. Acad. Sci. Hung.*, 1953, **3**, 75.
  - [27] SZENT-IVANYI (T.) et SZABO (S.). *Acta. vet. Acad. Sci. Hung.*, 1954, **4**, 429.
  - [28] SZYMANOWSKI (Z.), STETKIEWICZ (S.) et WACKLER (B.). *C. R. Soc. Biol.* 1926, **94**, 204.
  - [29] WROBLEWSKI (A.). *Thèse doct.*, Poznan (Pologne), 1959.
-

# **CARACTÉRISATION DES CHOLINESTÉRASES ET D'AUTRES ESTÉRASES CARBOXYLIQUES APRÈS ÉLECTROPHORÈSE ET IMMUNOÉLECTROPHORÈSE EN GÉLOSE**

## **I. — APPLICATION A L'ÉTUDE DES ESTÉRASES DU SÉRUM HUMAIN NORMAL**

par J. URIEL (\*\*)

(avec la collaboration technique de M<sup>lle</sup> Luz GUTIERREZ).

*(Service de Chimie microbienne, Institut Pasteur)*

Les estérases carboxyliques forment un groupe d'enzymes hydrolytiques très répandu dans les milieux biologiques, mais dont la spécificité, sauf dans le cas des cholinestérases, est encore assez mal connue. Dans ce travail, nous donnons des techniques de caractérisation de ces enzymes en gélose et leur application à l'étude de l'activité estérasique du sérum humain normal après séparation électrophorétique et immuno-électrophorétique en gélose. Une partie des procédés et des résultats rapportés ici a déjà été exposé dans une publication précédente (Uriel [19]).

### **MATÉRIEL.**

Sérum humain : un mélange de sérums humains normaux, conservés à la glacière à  $+ 4^{\circ}\text{C}$  ; il a été renouvelé environ tous les mois.

Immunsérums : des immunsérums de cheval et de mulet anti-sérum humain total ont été employés. Il s'agissait des immunsérums n<sup>os</sup> 282, 511, 223 et 224 (Serpasteur, Institut Pasteur, Paris).

Cholinestérase plasmatique humaine : une préparation purifiée provenant de Cutter Laboratories (Berkeley, Calif., U. S. A.).

HD-lipoprotéines : une préparation de lipoprotéines sériques de haute densité (1), mobilité électrophorétique en gélose =  $\alpha_1$  [20].

(\*) Manuscrit reçu le 9 mars 1961.

(\*\*) Chargé de Recherches au Centre National de la Recherche Scientifique.

(1) Nous remercions le Dr G. Sandor, qui a bien voulu nous fournir cette préparation.

FD-lipoprotéines : une préparation de lipoprotéines sériques de faible densité (mobilité électrophorétique =  $\alpha_2$  en gélose,  $\beta_1$  sur papier) obtenue par la méthode de Burstein [3].

Substrats : iodure d'acétyle et de butyryle thiocholine ; acétate et laurate de  $\beta$ -naphthyle (Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio, U. S. A.). Iodure de carbonaphtoxycholine (Mann Research Laboratories, New York N. Y., U. S. A.). Acétate d'indoxyle (Lights, Cornbrook, England).

Inhibiteurs : ésérine base et diisopropylfluorophosphate (DFP).

#### MÉTHODES.

ELECTROPHORÈSE ET IMMUNO-ELECTROPHORÈSE EN GÉLOSE. — La technique de Géabar et Williams [8] a été employée. Les essais électrophorétiques ont été effectués sur des plaques (10,5 cm de longueur et 4 mm d'épaisseur) de gel de gélose à 1 p. 100, imbibées de tampon véronal sodique, pH 8,2 ;  $\mu=0,025$ . Les dilutions finales, dans les prises d'essai, étaient de 1/2 à 1/3 pour les sérums humains et les préparations de lipoprotéines, et de 1/20 à 1/40 pour la préparation de cholinestérase plasmatique. La durée de l'électrophorèse a été, dans tous les cas, de soixante-quinze minutes, sous une différence de potentiel de 7-8 volts par centimètre.

COLORATION DES PROTÉINES ET DES LIPOPROTÉINES. — Les protéines ont été colorées par le noir amide et les lipoprotéines par le soudan noir (Uriel et Grabar [20]).

CARACTÉRISATION DES ESTÉRASES CARBOXYLIQUES. — Les techniques de caractérisation de ces enzymes en gélose, telles que nous les décrivons ci-dessous, ont été effectuées en adaptant ou en modifiant des procédés développés précédemment en histochimie ou en chimie analytique d'enzymes [6, 15].

En gélose, la caractérisation est réalisée, pour les plaques d'électrophorèse simple (E. G.), *immédiatement après la séparation électrophorétique* ; pour les plaques soumises à l'analyse immuno-électrophorétique (A. I. E.), *après lavage et dessiccation des plaques*.

##### 1° Caractérisation par les esters de $\beta$ -naphthyle.

Nachlas et Seligmann [14] ont été les premiers à utiliser ces substrats pour la détection des estérases. Le  $\beta$ -naphthol, libéré par l'hydrolyse de l'ester, se couple avec un sel de diazonium, en donnant lieu à la formation d'un colorant azoïque.

Milieu d'incubation. Dissoudre 5 mg d'acétate ou de butyrate



de  $\beta$ -naphtyle dans 0,5 ml d'acétone. Ajouter 25 ml de tampon phosphate 0,15 M (pH 7,2) ou de tampon tris (pH 7,2). Il se forme une solution opalescente, dans laquelle on dissout directement 10 mg d'orthodianisidine tétrazotée (Diazo Bleu B). Filtrer. Utiliser immédiatement.

*Mode opératoire.* Tremper les plaques de gélose dans le milieu d'incubation pendant soixante à quatre-vingt-dix minutes (plaques d'E. G.) ou pendant trente à soixante minutes (plaques d'A. I. E.). Laver ensuite une heure dans l'acide acétique à 2 p. 100. Sécher à l'étuve à 37° C (2).

Les endroits où les lignes possèdent une activité estérasique apparaissent colorés en rouge-violet.

### 2° Caractérisation par les esters d'indoxyle [2, 10].

Le radical indoxyle, libéré par hydrolyse enzymatique de l'ester, est rapidement oxydé, en présence d'oxygène atmosphérique, en un colorant insoluble, le bleu d'indigo.

*Milieu d'incubation.* Dissoudre 5 mg d'acétate d'indoxyle dans 0,5 ml d'acétone et, immédiatement après, ajouter 22 ml de tampon véronal sodique (pH 8,2 :  $\mu = 0,05$ ) et 2,5 ml d'acétate de cuivre  $10^{-3}$  M. Utiliser dans les huit heures.

*Mode opératoire.* Incuber les plaques d'E. G. pendant quatre heures, celles d'A. I. E. pendant deux heures. Laver ensuite pendant une heure à l'eau courante. Sécher (voir paragraphe 1°).

L'activité estérasique se manifeste par des taches (E. G.) ou des lignes (A. I. E.) de couleur bleue.

### 3° Caractérisation par les esters de la choline.

a) *Avec les esters de thiocholine.* — Ce procédé, que nous avons développé pour la caractérisation des cholinestérases à l'aide des esters de thiocholine, diffère de celui originellement décrit par Koelle et Friedenwald [11], ou des nombreuses variantes dont il a été l'objet.

Dans notre cas, le milieu d'incubation contient de l'acétylthiocholine (Ac. Th. Ch.) ou un autre ester de thiocholine et un sel de tétrazolium. Au fur et à mesure de l'hydrolyse de l'ester, la thiocholine libérée réduit le sel de tétrazolium en un dérivé formazylé (formazan) coloré et insoluble. Parmi les sels de tétra-

(2) Dans ce procédé, comme dans tous ceux rapportés ici, le séchage à l'étuve s'entend : sous papier filtre [20] pour les plaques d'E. G., directement pour celles d'A. I. E.

zolium que nous avons essayés à cet effet, seuls l'INT (3) et le Nitro-BT (4) sont réduits par la thiocholine.

*Milieu d'incubation.* Dissoudre 5 mg d'INT ou de nitro-BT dans 1 ml d'alcool éthylique. Ajouter 19 ml de tampon véronal (pH 8,2 ;  $\mu = 0,05$ ). Dissoudre directement dans cette solution 20 mg d'acétyle-thiocholine (Ac. Th. Ch.) ou de butyryle-thiocholine (Bu. Th. Ch.). Un milieu d'incubation dépourvu d'Ac. Th. Ch. ou de Bu. Th. Ch. servira pour contrôler l'absence, dans le matériel en étude, des substances réduisant spontanément les sels de tétrazolium.

*Mode opératoire.* Chauffer la solution précédente à 37-40° C et incuber à cette température les plaques d'E. G. pendant quatre-six heures et celles d'A. I. E. pendant deux-trois-quatre heures. Sécher à l'étuve (voir paragraphe 1°).

Les zones où les lignes possèdent une activité cholinestérasique apparaissent en bleu (Nitro-BT) ou en rouge (INT).

b) *Avec le iodure de carbonaphtoxycholine.* — Ce substrat a été synthétisé par Ravin [47]. L'acide  $\beta$  naphthyle-carbonique formé par hydrolyse enzymatique de l'ester est décarboxylé spontanément et le  $\beta$ -naphtol libre peut ainsi se coupler avec le sel de diazonium présent dans le milieu d'incubation.

*Mode opératoire.* Dissoudre 5 mg d'iodure de carbonaphtoxycholine et 10 mg de Diazo Bleu B dans 25 ml de tampon phosphate 0,15 M (pH 7,5) ou de tampon tris (pH 7,5). Filtrer. Incuber dans ce milieu pendant soixante à quatre-vingt-dix minutes (les plaques d'E. G.) ou pendant trente à soixante minutes (pour les plaques d'A. I. E.).

L'activité estérasique se manifeste par l'apparition de zones ou de lignes colorées en bleu-violet.

#### 4° *Emploi des inhibiteurs.*

On part des solutions concentrées qui sont amenées, au moment de leur emploi, aux dilutions finales voulues dans les tampons correspondants. Les plaques sont pré-inhibées pendant quinze minutes dans ces solutions et plongées ensuite dans les milieux d'incubation respectifs contenant aussi l'inhibiteur à la même dilution finale.

(3) INT : Chlorure de 2-(*p*.iodophényle)-3-*p*.-nitrophényle)-5-phényle phényle tétrazolium.

(4) Nitro-BT : Chlorure de 2,2'-di-*p*-nitrophényle-5,5'-diphényle-3,3'-(3,3'-diméthosy-4,4'-biphénylène)ditétrazolium

## RÉSULTATS.

1° *Activité estérasique du sérum après électrophorèse en gélose.*

Le pouvoir hydrolytique du sérum humain vis-à-vis des différents esters synthétiques que nous avons essayés est résumé dans la figure 1.

Il est évident, d'après ces résultats (fig. 1 et pl.) que l'acétate

Activité Estérasique du Sérum Humain Normal									
Im.	Zones et lignes d'activité							Substrat	
511								$\beta$ -Naphthyle acétate	
511								Butyryle - -Thio-Choline	
511								Carbonaphthoxy- -Choline	
511								Indoxyle acétate	
Z.M.E.	$\rho$	<del>alb</del> $\alpha_0$	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta_1$	$\beta_2$	$\gamma$		

FIG. 1. — Représentation schématique de l'activité estérasique du sérum humain normal. Im. = immunsérum anti-sérum humain. Z. M. E. = zones de mobilité électrophorétique. En pointillé = zones ou lignes de faible activité. Voir détails dans le texte.

de  $\beta$ -naphthyle est, parmi ceux que nous avons utilisés, le substrat le moins spécifique, et, par conséquent, celui qui permet de mettre en évidence le plus grand nombre d'estérases carboxyliques d'un mélange. Ce fait a été confirmé lorsque nous avons étudié, avec ce substrat, l'activité estérasique de différents extraits tissulaires [foie, rate, globules rouges, etc.] (Micheli et Grabar [13], Uriel et coll. [21]).

En ce qui concerne le sérum humain, l'acétate de  $\beta$ -naphtyle révèle 4 zones électrophorétiques d'activité estérasique. Nous les appellerons zones E1, E2, E3 et E4. Elles correspondent approximativement aux zones de migration électrophorétique des fractions  $\rho$  (E1), de la sérumalbumine, des  $\alpha_2$ -globulines (E3) et d'une zone intermédiaire entre les  $\alpha_2$ - et les  $\beta_1$ -globulines (E4).

Les esters de choline et de thiocholine sont hydrolysés à trois endroits : E1, E3 et E4. Quant à l'acétate d'indoxyle, il semble être le substrat le plus spécifique, puisqu'il ne révèle qu'une seule zone (E4) d'activité estérasique.

*2° Activité estérasique du sérum  
après l'analyse immuno-électrophorétique.*

Nous avons appliqué les techniques de caractérisation rapportées plus haut sur des échantillons de sérum humain soumis à l'analyse immuno-électrophorétique en gélose.

En utilisant l'immunsérum n° 511 (mélange de plusieurs immunsérums de cheval et de mulet anti-sérum humain total), les résultats obtenus sont les suivants (voir aussi fig. 1) :

Avec l'acétate de  $\beta$ -naphtyle, 5 lignes de précipitation spécifique du sérum humain normal montrent une activité estérasique. Leurs mobilités électrophorétiques correspondent à celles des zones d'activité estérasique révélées avec ce même substrat après électrophorèse simple en gélose (E. G.). Mais l'A. I. E. permettant une définition plus précise de ces constituants en fonction de leur vitesse de migration, nous les avons appelées respectivement  $\rho$ -estérase,  $\alpha_0$ -estérase,  $\alpha_1$ -estérase,  $\alpha_2$ -estérase et  $\alpha_2$ - $\beta_1$ -estérase.

Trois de ces constituants précités ( $\rho$ ,  $\alpha_2$  et  $\alpha_2$ - $\beta_1$ -estérases) hydrolysent les esters de thiocholine, de même que l'iodure de carbonaphtoxycholine. Cependant, l'hydrolyse de ce dernier substrat par la  $\rho$ -estérase et l' $\alpha_2$ -estérase est faible par rapport à l'activité estérasique du constituant  $\alpha_2$ - $\beta_1$ .

Comme dans le cas de l'E. G. avec l'acétate d'indoxyle, une seule ligne de précipitation montre une activité estérasique. Il s'agit du constituant ayant une mobilité électrophorétique  $\alpha_2$ - $\beta_1$ . Avec certains immunsérums, la ligne de précipitation de la sérumalbumine montre une faible activité estérasique vis-à-vis de tous les substrats essayés. Nous n'avons pas trouvé d'explication à ce fait.

Les lignes de précipitation correspondant aux estérases  $\alpha_0$  et  $\alpha_2$ - $\beta_1$  ne sont pas visibles dans le diagramme immuno-électrophorétique du sérum, et ceci ni en observation directe, ni après coloration par l'azocarmin ou un autre colorant des protéines. Seules les réactions de caractérisation à l'aide de certains des substrats utilisés permettent leur mise en évidence.

D'autres immunsérums, en plus du 511, ont été employés pour l'A. I. E. du sérum humain normal. Les résultats obtenus en ce qui concerne l'hydrolyse de l'acétate de  $\beta$ -naphthyle sont exposés dans la figure 2. On peut constater que les immunsérums 511 et 224 forment 5 lignes de précipitation ayant une activité estérasique, tandis que les 282 et 223 ne forment respectivement que 3 ( $\alpha_0$ ,  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ - $\beta_1$ -estérases) et 2 ( $\alpha_0$  et  $\alpha_2$ -estérases) de ces lignes de

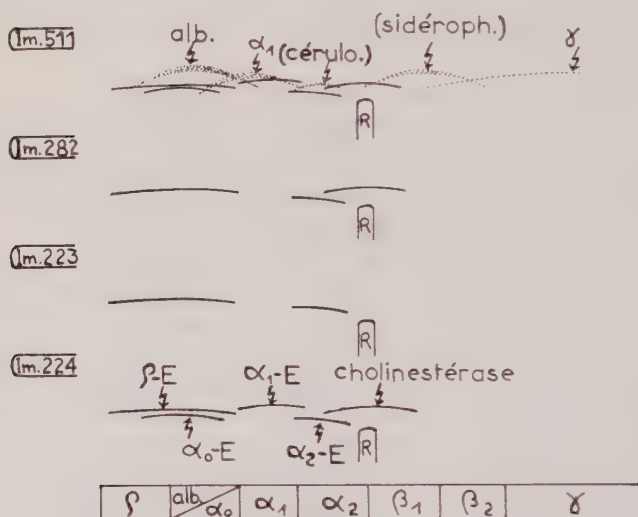


FIG. 2. — Activité estérasique du sérum humain normal après l'analyse immuno-électrophorétique avec différents immunsérums (Im.). En pointillé, quelques lignes de précipitation caractéristiques du diagramme immuno-électrophorétique du sérum humain : (alb.) = sérum albumine humaine ;  $\alpha_1$  =  $\alpha_1$ -globuline ; (cérulo.) = céruloplasmine ; (sidéroph.) = sidérophiline ;  $\gamma$  =  $\gamma$ -globulines ; R = réservoir de départ.

précipitation. Il en ressort l'importance du choix de l'immunsérum dans l'étude et la caractérisation d'enzymes après l'analyse immuno-électrophorétique (voir Discussion générale).

### 3° Essai d'identification des estérases carboxyliques du sérum

A. — L'étude électrophorétique et immuno-électrophorétique, par les techniques décrites, d'une préparation de cholinestérase plasmatique humaine, nous a permis d'identifier avec cette enzyme le constituant que nous avons désigné comme  $\alpha_2$ - $\beta_1$ -estérase (ou zone E4 d'activité estérasique après E. G.). En effet :

a) La préparation de cholinestérase et le constituant  $\alpha_2$ - $\beta_1$  ont la même mobilité électrophorétique.



b) L'épuisement de plusieurs immunosérums par la préparation de cholinestérase fait disparaître quelques lignes du diagramme immuno-électrophorétique du sérum, dont l'activité estérasique du constituant  $\alpha_2\text{-}\beta_1$ . Les autres lignes pourvues d'une activité estérasique ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  et  $\alpha_4$ -estérase) ne sont pas affectées par l'épuisement des immunosérums avec cette préparation.

c) En présence d'ésérine ou de DFP à des concentrations finales d'environ  $2.10^{-5}$  M, l'activité hydrolytique de la préparation de cholinestérase et celle du constituant  $\alpha_2\text{-}\beta_1$  sont entièrement inhibées. Les autres zones d'activité estérasique du sérum sont résistantes à ces inhibiteurs, au moins à la concentration maximale où nous les avons utilisés, c'est-à-dire environ  $10^{-4}$  M. voir pl.).

d) Comme la préparation de cholinestérase, le constituant  $\alpha_2\text{-}\beta_1$  hydrolyse plus rapidement le butyrate que l'acétate de thiocholine.

B. — Une étude similaire avec les deux préparations de lipoprotéines sériques dont nous disposions, nous a amené à l'identification de la zone d'activité E1 ou plus exactement de ce que nous avons appelé  $\alpha_1$ -estérase avec les lipoprotéines de haute densité. De même, le constituant  $\alpha_2$ -estérase (zone E3 d'activité estérasique) a pu être identifié avec les lipoprotéines de faible densité.

L'identification est basée sur les faits suivants :

a) Les deux préparations de lipoprotéines montrent une activité estérasique vis-à-vis de l'acétate de  $\beta$ -naphtyle et des esters de thiocholine.

b) L'épuisement des immunosérums par ces préparations fait disparaître l'activité estérasique correspondant aux constituants  $\alpha_1$ -estérase et  $\alpha_2$ -estérase du sérum.

c) Après l'analyse immuno-électrophorétique de deux échantillons du même sérum, une des plaques a été révélée par l'acétate de  $\beta$ -naphtyle et l'autre traitée par un colorant des lipides (Soudan Noir, Oil Red O, etc.). Dans ces conditions, les deux lignes de précipitation soudanophiles du sérum ( $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ -lipoprotéines) se superposent respectivement avec la  $\alpha_1$ -estérase et l' $\alpha_2$ -estérase.

d) Afin de préciser la spécificité de ces estérases et étant donné la présence de lipides dans leur constitution, nous avons fait des essais de caractérisation en présence de laurate de  $\beta$ -naphtyle qui est censé être un substrat relativement spécifique d'un groupe d'estérases carboxyliques, les lipases. Mais, après l'E. G. ou l'A. I. E. du sérum, aucune activité hydrolytique n'a pu être révélée vis-à-vis de ce substrat. L'addition au milieu d'incubation de taurocholate de sodium, activateur des lipases, n'a aucune

influence sur le résultat de ces expériences. Par contre, les sels de calcium à une concentration molaire supérieure à  $10^{-2}$  activent le pouvoir estérasique de ces lipoprotéines.

c) De l'avis des histochimistes (Pearse [15]), quelques colorants azoïque dérivés du couplage des naphthols avec le sel de diazonium sont solubles dans les lipides. Nous avons recherché si ce fait pouvait expliquer la présence d'une activité estérasique liée aux lipoprotéines du sérum. Pour cela, nous avons opéré ainsi : avant de procéder à la réaction de caractérisation, nous avons traité les plaques pendant trente minutes dans une solution d'alcool à 50 p. 100 contenant 5 p. 100 d'acide acétique ; après lavage des plaques dans l'eau courante, la caractérisation de l'activité estérasique a été pratiquée de la façon décrite plus haut mais en additionnant le milieu d'incubation (acétate de  $\beta$ -naphthyle + Diazo Bleu B) d'une certaine quantité de la préparation de cholinestérase plasmatique dans le but de provoquer la formation catalytique de colorant azoïque. Dans ces conditions, aucune trace de coloration bleu-violet n'a pu être révélée sur les lignes de précipitation.

L'expérience semble assez concluante pour affirmer que l'activité estérasique détectée sur les lipoprotéines sériques n'est pas une réaction non-spécifique, mais due à un réel pouvoir catalytique propre de ces constituants sériques.

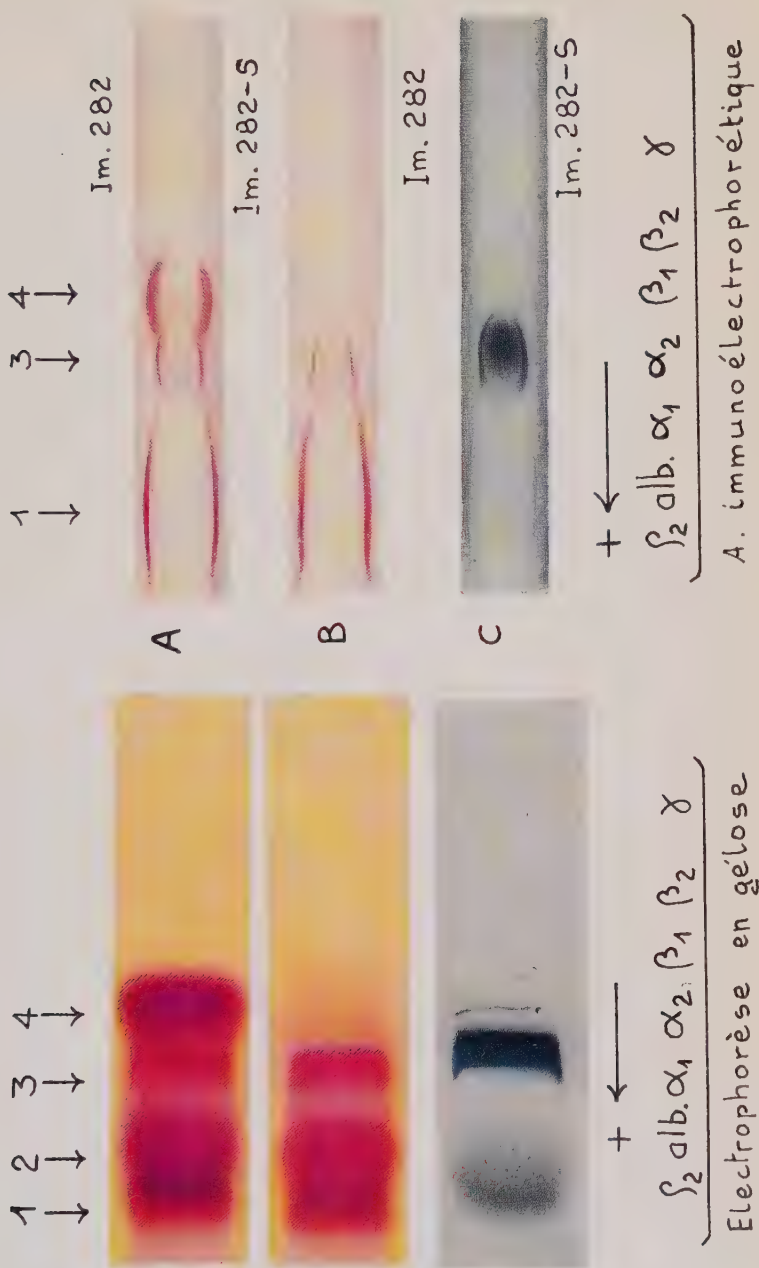
C. — Des deux autres constituants sériques pourvus d'activité estérasique vis-à-vis de l'acétate de  $\beta$ -naphthyle, l' $\alpha_0$ -estérase n'avait pas été repérée en tant que constituant du diagramme immuno-électrophorétique du sérum (Burtin [4]). Elle est, d'autre part, distincte du séromucoïde acide, une  $\alpha_0$ -globuline du sérum (Vaux Saint-Cyr [22]). Quant à l'estérase  $\alpha_1$ , elle est une des lignes de précipitation de la zone des  $\alpha_1$ -globulines (Burtin [4]).

Ces deux constituants estérasiques du sérum, ainsi que l' $\alpha_2$ - $\beta_1$ -estérase (cholinestérase) sont inhibées par le chauffage préalable du sérum à 60° C pendant une heure.

Toutes les estérases sériques décelées sont aussi inhibées par les sels de  $\text{Cu}^{++}$  à une concentration molaire de  $10^{-3}$ .

#### LÉGENDE DE LA PLANCHE

A = estérases carboxyliques du sérum humain révélées avec l'acétate de  $\beta$ -naphthyle. B = Id. id. après inhibition par le D. F. P. C. = coloration des lipoprotéines sériques. Im. 282 = immunsérum n° 282. Im. 282 S = immunsérum 282 épuisé par le séromucoïde acide.





D. — Dans le tableau I, les données immuno-électrophorétiques des constituants du sérum pourvus d'une activité estérasique sont résumées.

La première colonne groupe les lignes de précipitation qui se sont avérées posséder une activité estérasique vis-à-vis de l'acétate de  $\beta$ -naphthyle. La désignation que nous leur donnons ne tient compte que de la mobilité électrophorétique de chaque constituant. Dans la colonne centrale est indiqué le rapport existant entre les différentes estérases détectées et les lignes de précipi-

TABLEAU I. — Estérases carboxyliques du sérum humain normal.

DÉSIGNATION EN FONCTION DE LA MOBILITÉ ÉLECTROPHORÉTIQUE	Ur (*)	IDENTITÉ ÉTABLIE AVEC DES CONSTITUANTS DU DIAGRAMME I. E. DU SÉRUM	DÉSIGNATION PROPOSÉE
$\rho$ -estérase . . . . .	1,3-1	$\rho$ - $\alpha_1$ -lipoprotéine (**)	$\rho$ -estérase lipoprotéique
$\alpha_0$ -estérase . . . . .	1,1-0,95	une $\alpha_1$ -globuline $\alpha_2$ -lipoprotéine (***)	$\alpha_2$ -estérase lipoprotéique cholinestérase
$\alpha_1$ -estérase . . . . .	0,95-0,85		
$\alpha_2$ -estérase . . . . .	variable [4]		
$\alpha_2$ - $\beta_1$ -estérase . . . . .	0,66-0,55		

(\*) Ur : mobilité électrophorétique relative [19].  
 (\*\*) Lipoprotéines rapides en gélose [20],  $\alpha$ -lipoprotéines en électrophorèse sur papier, lipoprotéines de haute densité.  
 (\*\*\*) Lipoprotéines lentes en gélose [-],  $\beta$ -lipoprotéines en électrophorèse sur papier, lipoprotéines de faible densité.

tation préalablement repérées et déjà consignées dans des travaux précédents sur l'A. I. E. du sérum humain [4, 8, 20].

La troisième colonne est destinée à grouper, quand cela est possible, les dénominations propres aux différentes estérases carboxyliques, dénominations basées sur une activité biologique particulière ou une constitution chimique caractéristique.

L'emploi des différents inhibiteurs chimiques n'a permis de distinguer que deux groupes d'estérases dans le sérum : l'un constitué par la cholinestérase, sensible à des faibles concentrations d'ésérine ou de phosphates organiques, et l'autre formé par les quatre autres constituants estérasiques ( $\rho$ ,  $\alpha_0$ ,  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ -estérase) résistant à ces substances. D'autre part, le chauffage préalable du sérum à 60° C permet de distinguer deux groupes d'estérases : l'un thermolabile ( $\alpha_0$ ,  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ - $\beta_1$ -estérase), l'autre thermostable ( $\rho$  et  $\alpha_2$ -estérase lipoprotéiques) [voir tableau II].



TABLEAU II.

ZONE D'ACTIVITÉ ESTÉRASIQUE (E. G.)	CONSTITUANT A. I. E.	SUBSTRATS HYDROLYSÉS	INHIBITION TOTALE	ACTIVATION
E <sub>1</sub> E <sub>2</sub>	$\epsilon$ -estérase	Acétate de $\beta$ -naphtyle Esters de thiocholine Carbonaphtoxycholine	Cu <sup>++</sup> $10^{-3}$ M	Cl <sub>2</sub> Ca $10^{-2}$ M
E <sub>2</sub>	$\alpha_0$ -estérase	Acétate de $\beta$ -naphtyle	Cu <sup>++</sup> $10^{-3}$ M Chaleur	
? *	$\alpha_1$ -estérase *	Acétate de $\beta$ -naphtyle	Cu <sup>++</sup> $10^{-3}$ M Chaleur	
E <sub>3</sub>	$\alpha_2$ -estérase	Acétate de $\beta$ -naphtyle Esters de thiocholine Carbonaphtoxycholine	Cu <sup>++</sup> $10^{-3}$ M	Cl Ca $10^{-2}$ M
E <sub>4</sub>	$\alpha_2$ - $\beta_1$ -estérase (cholines- térase)	Acétate de $\beta$ -naphtyle Esters de thiocholine Carbonaphtoxycholine Acétate d'indoxyle	Esérine $2.10^{-5}$ M DFP $2.10^{-5}$ M Cu <sup>++</sup> $10^{-3}$ M Chaleur	

\* On ne détecte pas d'activité dans cette zone de migration après l'électrophorèse simple en gélose, probablement du fait de la faible concentration sérique de cette estérase

## DISCUSSION.

La dénomination d'estérases carboxyliques englobe un groupe d'hydrolases catalysant la réaction générale  $R-COOR' + H_2O \rightarrow R-COOH + R'OH$ . Depuis quelques années, ces enzymes ont été l'objet de nombreux travaux de la part surtout des histochimistes. Les résultats qui ont été rapportés sont quelquefois contradictoires et, en tout cas, difficiles à accorder dans un ensemble cohérent. Ceci est dû à la diversité des sources (organes, tissus, liquides biologiques, etc.) à partir desquelles a été obtenu le matériel d'étude et au manque de substrats ou d'inhibiteurs hautement spécifiques.

La nomenclature actuelle concernant les estérases carboxyliques est donc imprécise et sujette à caution. Cependant, d'après les dernières revues sur cette question [1, 6, 15], la classification suivante semble, pour l'instant, pouvoir être retenue :

a) *Estérases non spécifiques* (A-estérase, aryl-estérases (5), esté-

(5) Les dénominations basées sur la structure cyclique des substrats sont inadéquates, étant donné que ces estérases hydrolysent également des esters aliphatiques.

rases aromatiques : elles hydrolysent des esters aromatiques ou aliphatiques des acides gras de courte chaîne carbonée ( $C_2-C_4$ ) et sont résistantes à l'ésérine et aux phosphates organiques (au moins à des concentrations molaires inférieures à  $10^{-4}$ ).

b) *Lipases* (ali-estérases) : elles catalysent de préférence l'hydrolyse des esters (aromatiques ou aliphatiques) des acides gras de longue chaîne carbonée ( $>C_4$ ) et semblent être résistantes à l'ésérine mais pas aux phosphates organiques. En plus, elles sont activées par le taurocholate de sodium.

c) *Cholinestérases* : elles hydrolysent de préférence les esters de la choline, la longueur de la chaîne du résidu d'acide gras ayant peu d'importance pour la spécificité. Cependant, des différences dans la vitesse d'hydrolyse ont pu être trouvées entre les deux types de cholinestérases, actuellement reconnus : l'acétylcholinestérase (présente dans les globules rouges) et la pseudo-cholinestérase ou cholinestérase sérique. Ces enzymes hydrolysent également des esters aromatiques des acides gras de courte chaîne carbonée. Leur propriété la plus caractéristique est celle d'être inhibées par de très faibles concentrations d'ésérine ou de phosphates organiques.

L'étude de l'activité estérasique du sérum humain, après électrophorèse sur papier [12, 16], sur colonne de cellulose [4] et en gel d'amidon [7, 9] a fait l'objet de plusieurs travaux antérieurs aux nôtres.

L'existence d'une zone d'activité entre les  $\alpha_2$  et les  $\beta$ -globulines, identifiée avec la cholinestérase sérique, a été rapportée dans tous les cas. En plus, de cette zone, Augustinsson [4], Pinter [16], Marton et Kalow [12] constatent la présence d'une autre zone située au niveau de la sérumalbumine, zone d'activité résistante à l'ésérine et aux phosphates organiques et pouvant être classée dans le groupe des estérases non spécifiques. De leur côté, Grouchy [9] et Dubbs et coll. [7] signalent en plus l'existence d'une troisième zone d'activité ayant une mobilité électrophorétique intermédiaire par rapport aux deux précédentes. Les résultats de ces derniers auteurs ont été obtenus après électrophorèse en gel d'amidon et en utilisant comme substrat l'acétate de  $\beta$ -naphthyle.

Des quatre zones d'activité stérasique (E1, E2, E3 et E4) que nous avons mises en évidence après électrophorèse en gélose du sérum et à l'aide de ce même substrat (acétate de  $\beta$ -naphthyle), une (zone E4) correspond à la cholinestérase, les trois autres étant des estérases non spécifiques. Mais le parallélisme entre ces trois zones et celles rapportées par d'autres auteurs est difficile à établir, étant donné qu'un même constituant peut avoir une

mobilité différente selon le support électrophorétique utilisé.

En ce qui concerne l'autre groupe d'estérases carboxyliques, les lipases, les travaux rapportés (Augustinsson [4], Marson et Kalow [12]) ainsi que nos propres résultats s'accordent sur l'absence d'activité lipasique dans le sérum humain normal.

La caractérisation des estérases après l'analyse immuno-électrophorétique s'est montrée un procédé supérieur à ceux qui ont été essayés jusqu'à présent. Non seulement, il a permis d'individualiser un plus grand nombre d'estérases carboxyliques dans le sérum humain, mais aussi d'en préciser la mobilité électrophorétique et d'établir leur rapport avec d'autres constituants sériques du diagramme immuno-électrophorétique. Grâce à l'A. I. E., il a été possible d'obtenir des informations supplémentaires pour certaines des estérases révélées. C'est ainsi que les estérases et  $\alpha_2$  ont pu être identifiées avec, respectivement, les lipoprotéines de haute et de faible densité. Ce fait nécessite, évidemment, une étude plus approfondie afin d'élucider si l'activité estérasique est liée au complexe lipoprotéique lui-même ou si la formation d'un complexe lipoprotéique est seulement la conséquence de l'activité estérasique du support protéique. Quoi qu'il en soit, le fait constaté doit pouvoir contribuer à une meilleure connaissance du métabolisme des lipides en général et des lipoprotéines sériques en particulier.

L'emploi de différents substrats pour la caractérisation des estérases a mis en évidence d'une façon générale leur faible spécificité. Nous n'avons pas pu confirmer la haute spécificité vis-à-vis de la cholinestérase attribuée aux esters de thiocholine [11] et à la carbonaphthoxycholine [15], ces substrats étant également hydrolysés par les deux estérases lipoprotéiques. Par contre, l'acétate d'indoxyle qui est censé être un substrat général d'estérases carboxyliques s'est avéré, dans nos conditions de travail et avec le matériel étudié, très spécifique des cholinestérases. Il est à souhaiter que le développement des nouveaux substrats ou la recherche de nouveaux inhibiteurs permettent une meilleure discrimination de ces enzymes.

La caractérisation après l'électrophorèse en gélose des activités enzymatiques d'un mélange d'antigènes est un des meilleurs moyens de déceler, dans ce mélange, l'existence d'une ou plusieurs enzymes données et en même temps de préciser leur zone de mobilité électrophorétique. Logiquement, c'est au niveau de ces zones que l'on doit trouver, après immuno-électrophorèse, une ou plusieurs lignes de précipitation ayant une activité enzymatique. Lorsque cela n'est pas, comme nous venons de le montrer dans le cas des estérases sériques révélées après immuno-électrophorèse avec certains immunsérums, l'échec peut être dû (Cina-

der [5]) soit à l'absence d'anticorps anti-enzyme dans l'immunosérum, soit, si l'anticorps est présent, au blocage de l'activité enzymatique lors de la formation du complexe antigène-anticorps.

Nous avons déjà attiré l'attention (Uriel [18]) sur les possibilités que l'A. I. E., combinée à des réactions chimiques de caractérisation offre pour l'étude des enzymes dans les milieux biologiques. Le grand pouvoir de résolution ou d'individualisation qu'a l'immuno-électrophorèse joint à l'identification d'une enzyme par son activité biologique, permet une plus grande finesse dans le dénombrement des constituants enzymatiques et aussi une interprétation des résultats plus poussés parce que faite en fonction de la double spécificité biologique et immunochimique. Cette dernière, en particulier, permet d'individualiser un ensemble d'enzymes ayant une activité biologique voisine. C'est le cas, par exemple, des estérases carboxyliques du sérum. Après l'A. I. E., on peut affirmer que les 5 constituants estérasiques décelés sont distincts en ce sens que le site d'activité enzymatique propre à chacun d'eux est porté sur des molécules protéiques distinctes.

#### RÉSUMÉ.

Des techniques pour la caractérisation des estérases carboxyliques après l'électrophorèse et l'immuno-électrophorèse en gélose sont décrites. Elles ont été appliquées à l'étude des estérases du sérum humain normal.

En utilisant comme substrat l'acétate de  $\beta$ -naphtyle, 4 zones d'activité estérasique ont été décelées dans le sérum soumis à l'électrophorèse en gélose. Avec ce même substrat, 5 lignes de précipitation du diagramme immuno-électrophorétique du sérum montrent une activité estérasique. En fonction de leur mobilité électrophorétique, elles ont été désignées :  $\rho$ ,  $\alpha_0$ ,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\alpha_2$ - $\beta_1$ -estérases. Ce dernier constituant a été identifié avec la cholinestérase sérique. Les estérases  $\rho$  et  $\alpha_2$  ont été identifiées avec, respectivement, les lipoprotéines de haute et de faible densité. Seule, parmi les estérases décelées, la cholinestérase est inhibée par des faibles concentrations (env.  $2.10^{-5}$  M) d'ésérine ou des phosphates organiques. Trois des constituants estérasiques ( $\alpha_0$ ,  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ - $\beta_1$ ) sont thermolabiles ; les deux autres ( $\rho$  et  $\alpha_2$ ) sont thermostables.

Plusieurs substrats, en plus de l'acétate de  $\beta$ -naphtyle ont été essayés. L'acétate d'indoxyle semble être hautement spécifique pour la caractérisation des cholinestérases du sérum humain.

Les possibilités qu'offre l'analyse immuno-électrophorétique pour le dénombrement et l'identification d'enzymes sont étudiées.



## SUMMARY

CHARACTERISATION OF CHOLINESTERASE AND OTHER CARBOXYLIC ESTERASES AFTER ELECTROPHORESIS IN AGAR GEL AND IMMUNOELECTROPHORESIS.

I. — APPLICATION TO THE STUDY OF ESTERASES  
IN NORMAL HUMAN SERUM.

Techniques allowing the characterization of carboxylic esterases after electrophoresis and immunoelectrophoresis in agar gel are described. They have been applied to the study of normal human serum.

With  $\beta$ -naphthyl-acetate as substrate, four zones of esterase activity were demonstrated in serum submitted to agar-electrophoresis. With the same substrate, five precipitation lines of the immunoelectrophoretic diagram show an esterase activity. The esterases were classified according to their electrophoretic mobility as :  $\varrho$ ,  $\alpha_0$ ,  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$ - $\beta_1$  esterases. This last constituent proved identical with serum cholinesterase. The  $\varrho$  and  $\alpha_2$  esterases proved identical with the high and low density lipoproteins respectively. Only cholinesterase among the esterases studied is inhibited by low concentrations (about  $2 \times 10^{-5}$  M) of eserine or organic phosphates. Three of the esterases demonstrated ( $\alpha_0$ ,  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$ - $\beta_1$ ) are thermolabile ; the other two ( $\varrho$  and  $\alpha_2$ ) are thermostable.

Beside  $\beta$ -naphthyl-acetate, several substrates were studied. Indoxyl-acetate seems to be highly specific for the identification of choline esterases of human serum.

The importance of the immunoelectrophoresis for the enumeration and identification of enzymes is discussed.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] AUGUSTINSSON (K. B.). *Nature*, 1958, **181**, 1786.
- [2] BARNETT (R.) and SELIGMAN (A. M.). *Science*, 1951, **114**, 576.
- [3] BURSTEIN. C. R. *Acad. Sci.*, 1956, **243**, 527.
- [4] BURTIN (P.). In GRABAR (P.) et BURTIN (P.). *L'analyse immuno-électrophorétique ; ses applications aux milieux biologiques humains*, Masson, édit., Paris, 1960.
- [5] CINADER (B.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1955, **37**, 783.
- [6] DEANE (H. W.), BARNETT (R.) and SELIGMAN (A. M.). In GRAUMAN et NEUMANN. *Handbuch der Histochemie*, G. Fischer, édit., Stuttgart, 1960.
- [7] DUBBS (C. A.), VIVONIA (Ch.) and HILBURN (J. M.). *Science*, 1960, **131**, 1529.
- [8] GRABAR (P.) et WILLIAMS (C. A. Jr). *Biochim. Biophys. Acta*, 1953, **10**, 193.



- [9] GROUCHY (J. J.). *Rev. Franç. Et. Clin. Biol.*, 1958, **3**, 881.
  - [10] HOLT (J. J.). *Nature*, 1952, **169**, 271.
  - [11] KOELLE (G. B.) and FRIEDENWALD (J. S.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1949, **70**, 617.
  - [12] MARTON (A.) and KALOW (W.). *Canad. Biochem. Physiol.*, 1959, **37**, 1367.
  - [13] MICHELI (A.) et GRABAR (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, **100**, 569.
  - [14] NACHLAS (M. M.) and SELIGMAN (A. M.). *J. Nat. Cancer Inst.*, 1949, **9**, 415.
  - [15] PEARSE (A. G. E.). *Histochemistry*, J. A. Churchill, édit., Londres, 1960.
  - [16] PINTER (I.). *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, 1957, **11**, 39.
  - [17] RAVIN (H. A.), TSOU (K. C.) and SELIGMAN (A. M.). *J. biol. Chem.*, **191**, 843.
  - [18] URIEL (J.). *Clin. Chim. Acta*, 1958, **3**, 17.
  - [19] URIEL (J.). In GRABAR (P.) et BURTIN (P.). *L'analyse immuno-électrophorétique; ses applications aux milieux biologiques humains*, Masson, édit. Paris, 1960.
  - [20] URIEL (J.) et GRABAR (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 427.
  - [21] URIEL (J.), WEBB (T.) et LAPRESLE (Cl.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1960, **42**, 1285.
  - [22] VAUX SAINT-CYR (Ch. de), COURCON (J.) et GRABAR (P.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1958, **40**, 579.
-

# LES INCLUSIONS INTRANUCLÉAIRES ÉOSINOPHILES D'ASPECT CRISTALLIN PRODUITES PAR LES ADÉNOVIRUS DE TYPES 5 ET 6

par A. BETZ et J. MAURIN (\*).

(Laboratoire de l'Etat, Luxembourg  
et Institut Pasteur, Service des Virus)

Un virus isolé au cours de l'été 1959 (1) des matières fécales d'une petite fille qui présentait un état infectieux bénin accompagné d'une réaction méningée légère, clinique et biologique, fut le point de départ de quelques constatations concernant les inclusions intranucléaires éosinophiles d'aspect cristallin observées avec certains types d'adénovirus. Il nous semble intéressant de les rapporter brièvement.

La destruction « en maille » des cellules de souche par ce virus suggérait tout de suite qu'il pouvait s'agir d'un adénovirus, fait rapidement confirmé par une réaction de déviation du complément fortement positive du surnageant brut avec un sérum de référence anti-A. P. C., et ceci, jusqu'à des dilutions fort élevées (unité antigénique 1.80). Le titre infectieux sur cellules KB était dès le quatrième passage de  $10^{7,5}$  DI<sub>50</sub> par ml pour une durée d'observation de dix jours. Le typage (2) montrait qu'il s'agissait d'un adénovirus de type 5.

Il restait néanmoins que les cultures cellulaires, après coloration à l'hémalum-érythrosine, bien qu'elles aient montré au premier stade de l'infection des lésions classiques d'adénovirus, présentaient à un stade tardif des noyaux contenant dans une très large proportion, à côté de la masse basophile ramassée au centre, des formations fortement éosinophiles, homogènes et d'une forme curieusement géométrique (pl. I, fig. 1 et 2 ; pl. II, fig. 3). Ces

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 2 mars 1961.

(1) Le virus en question a été isolé au Medizinal Untersuchungsamt de Trèves, et nous remercions vivement le Dr J. Albrecht de nous l'avoir envoyé.

(2) Nous remercions le Dr Chany, qui a bien voulu procéder au typage de notre virus au Service des Virus de l'Institut Pasteur (Dr Pierre Lépine).

masses en forme de parallélipipède, souvent multiples, de sorte que quelques noyaux en sont littéralement bourrés (pl. II, fig. 4), restent strictement intranucléaires, déformant la membrane nucléaire intacte. Sur tous les passages ultérieurement étudiés, le phénomène se reproduit régulièrement, tandis que les cultures témoins gardent leur aspect normal.

Les « barres » en question sont nettement apparentes à l'état frais en contraste de phase, ce qui exclut tout artéfact de fixation ou de coloration (pl. III, fig. 5). Par tous ces moyens d'observation elles apparaissent comme des bandes très minces et souvent superposées dans la profondeur du noyau.

Nous avons étudié le même virus sur une souche cellulaire au métabolisme beaucoup plus lent (3) et où l'étude des différents stades évolutifs est plus aisée. Il semble bien qu'il y ait, après condensation de la substance basophile au centre du noyau, apparition à la périphérie d'une masse éosinophile (pl. III, fig. 6) d'abord un peu granuleuse, devenant de plus en plus homogène et dense et qui, en se contractant, tend à prendre une forme géométrique à faces parallèles, en laissant autour d'elle un espace d'aspect « vide ».

Sur des cellules amniotiques humaines de première explantation, nous avons retrouvé les mêmes barres éosinophiles intranucléaires. Mais on y trouve également des cellules où des bandes de même aspect apparaissent dans le cytoplasme. Ces deux aspects peuvent d'ailleurs se réunir dans la même cellule. Sur cellules thyroïdiennes humaines de première explantation les formations éosinophiles intranucléaires d'aspect cristallin sont également abondantes et on retrouve le même phénomène de condensation progressive de la substance éosinophile déjà observé sur cellules « T » (pl. 4, fig. 7 et 8).

Le titre infectieux élevé, le titre élevé en antigène déviant le complément, joints à la tendance bien connue des adénovirus de donner des amas cristallins de particules facilement observés à l'intérieur du noyau en microscopie électronique, suggéraient qu'il pouvait s'agir d'une cristallisation très apparente de particules virales au sein des noyaux. Mais toutes les colorations de Feulgen que nous avons pratiquées montrent ces formations géométriques éosinophiles dépourvues d'acide désoxyribonucléique, tandis qu'elles apparaissent positives à la réaction de Millon. Puisqu'il est admis que l'acide nucléique des adénovirus est un acide désoxyribonucléique (Morgan et coll. [6]), ceci est en contradiction avec l'idée d'amas de particules complètes de virus, comme

(3) Il s'agit de la souche T (rein humain), mise à notre disposition par le professeur Gispén, d'Utrecht, et dont nous le remercions vivement.

ceux décrits par Bloch, Morgan et coll. [1]. Par contre, les formations que nous avons observées semblent correspondre à celles décrites par Leuchtenberger et Boyer [4] et étudiées au microscope électronique par Morgan et coll. [7, 8]. Ces derniers ont vu ces inclusions éosinophiles d'un adénovirus également de type 5 constituées par un réseau cristallin qui est très probablement de nature protéique et dépourvues de particules complètes de virus. En ce qui concerne les formations cristallines que nous avons observées, elles vont faire l'objet d'une étude au microscope électronique dans le service des Virus de l'Institut Pasteur à Paris.

Il nous a semblé intéressant d'étudier d'autres souches de type 5 et différents autres types d'adénovirus quant à la formation de ces inclusions éosinophiles cristallines. Les cinq souches de type 5 (4) que nous avons pu étudier montrent abondamment le phénomène. Les trois souches de type 6 produisent les mêmes inclusions cristallines éosinophiles à un degré à peine moins prononcé. Les autres souches que nous avons pu étudier, dont une du type 1, une du type 2, une du type 3, deux du type 4 et deux du type 7 n'en produisent pas.

Frappés par le fait que ce phénomène qui nous a paru pourtant très spectaculaire et facile à observer dans nos conditions, n'a pas été signalé plus fréquemment au cours des études effectuées sur l'effet cytopathogène des adénovirus, nous avons entrepris, après avoir éliminé une action possible des antibiotiques contenus dans nos milieux de culture, une étude de l'effet des différents fixateurs sur la colorabilité de ces inclusions. Nous avons eu la surprise de constater que seul le méthanol gardait intacte la colorabilité à l'érythrosine et, qu'après fixation avec le formol, l'alcool éthylique, l'alcool isopropylique, l'éther éthylique, le Bouin à l'eau, le Bouin alcoolique (Dubosecq-Brazil), le Zenker, seuls les contours restaient visibles à une observation attentive (pl. IV, fig. 8).

Il nous semble intéressant de signaler que Leader [3] dans une note récente, décrit dans plusieurs souches du virus de l'hépatite du chien (maladie de Rubarth) en cultures de tissu des inclusions d'aspect cristallin, dont les images ressemblent à celles des adénovirus et qu'un rapprochement entre le virus de la maladie de Rubarth et les adénovirus vient d'être fait récemment par J. Kapsenberg [2].

Le fait de trouver des réseaux cristallins non viraux à l'intérieur des cellules au cours du cycle de reproduction virale, n'est d'ailleurs pas isolé. Ils ont été bien étudiés dans la maladie des

(4) La provenance de nos souches de type 5 est la suivante : U. S. A., France, Afrique (Brazzaville), Hollande, Allemagne.

polyèdres des insectes (Morgan et coll. [5], Vago et Croissant [11]) et plus récemment Reczko décrit dans la variole des porcs des faits du même ordre [9].

Il semble bien que la production au cours du métabolisme viral de substances protéiques cristallisables au sein même de la cellule puisse être un fait d'une portée générale. Il est séduisant de penser que ces protéines soient identiques aux protéines constitutionnelles du virus, comme cela a été décrit pour la protéine X de la mosaïque du tabac (Takahashi et Gold [10]). L'apparition de ces cristaux résulterait alors de la surproduction massive de la partie protéique vis-à-vis de l'acide nucléique au cours de la reproduction virale et d'une symétrie suffisante de ces molécules protéiques pour permettre de constituer d'une part un revêtement continu et homogène autour de l'acide nucléique disponible et d'autre part des réseaux cristallins dépourvus d'acide nucléique.

En fait, ce ne sont là que des hypothèses qui nécessitent et méritent encore de multiples recherches.

#### RÉSUMÉ.

Description d'inclusions intranucléaires éosinophiles d'aspect cristallin au cours de la multiplication des adénovirus de types 5 et 6. Seul le méthanol parmi les fixateurs étudiés garde intacte leur colorabilité par l'érythrosine.

#### SUMMARY

THE CRYSTALLINE, EOSINOPHILIC, INTRANUCLEAR INCLUSION BODIES INDUCED BY ADENOVIRUSES TYPES 5 AND 6.

Description of crystalline, eosinophilic, intranuclear inclusion bodies appearing in the course of adenoviruses types 5 and 6 multiplication. Among the fixators studied, methanol alone preserves their staining capacity by erythrosin.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BLOCH (D. P.), MORGAN (C.), GODMAN (G. C.), HOWE (C.) and ROSE (H. M.). *J. Biophys. Biochem.*, 1957, **3**, 1.
- [2] KAPSENBERG (J. G.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1959, **101**, 611.
- [3] LEADER (R. W.), POMERAT (C. M.) and LEFEBER (C. G.). *Virology*, 1960, **10**, 268.
- [4] LEUCHTENBERGER (C.) and BOYER (G. S.). *J. Biophys. Biochem.*, 1957, **3**, 323.
- [5] MORGAN (C.), BERGOLD (G. H.), MOORE (D. H.) and ROSE (H. M.). *J. Biophys. Biochem.*, 1955, **1**, 187.



- [6] MORGAN (C.), HOWE (C.), ROSE (H. M.) and MOORE (D. H.). *J. Biophys. Biochem.*, 1956, **2**, 351.
- [7] MORGAN (C.), GODMAN (G. C.), ROSE (H. M.), HOWE (C.) and HUANG (J. S.). *J. Biophys. Biochem.*, 1957, **3**, 505.
- [8] MORGAN (C.) and GODMAN (G. C.). *J. exp. Med.*, 1960, **112**, 373.
- [9] RECZKO (E.). *Arch. ges. Virusforsch.*, 1959, **9**, 193.
- [10] TAKAHASHI (W. N.) and GOLD (H.). *Virology*, 1960, **10**, 449.
- [11] VAGO (C.) et CROISSANT (O.). *Arch. ges. Virusforsch.*, 1960, **10**, 126.

## PLANCHE I

FIG. 1 et 2. — Cellules KB, infectées par un adénovirus du type 5, depuis quarante-huit heures. Fixation au méthanol. Coloration hémalum-érythrosine. Inclusions éosinophiles en forme de barres très minces.

---

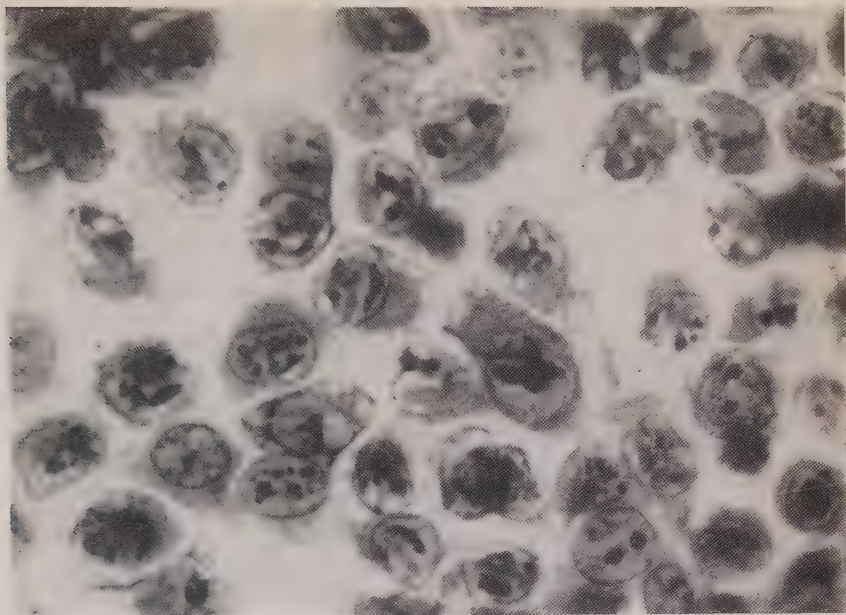


FIG. 1.

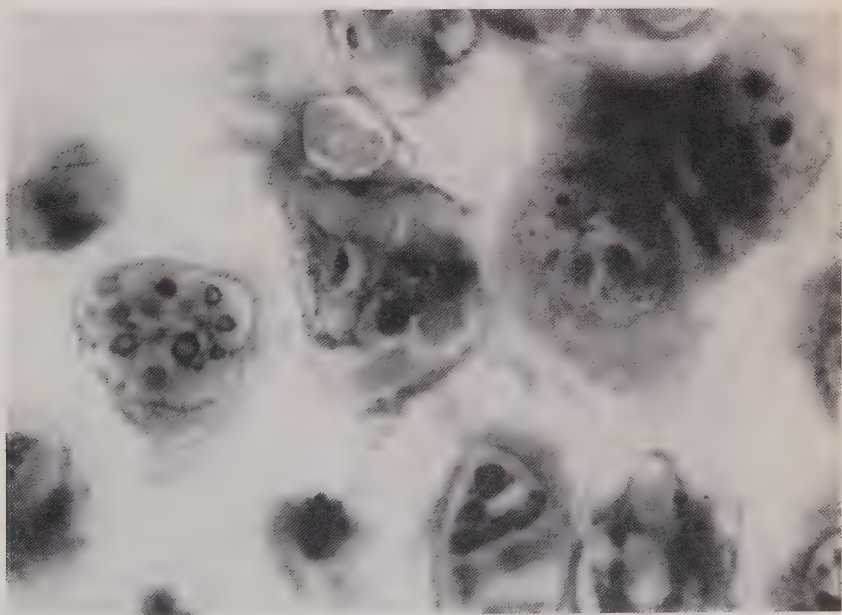


FIG. 2.

PLANCHE II

FIG. 3 et 4. — Même légende que figures 1 et 2.

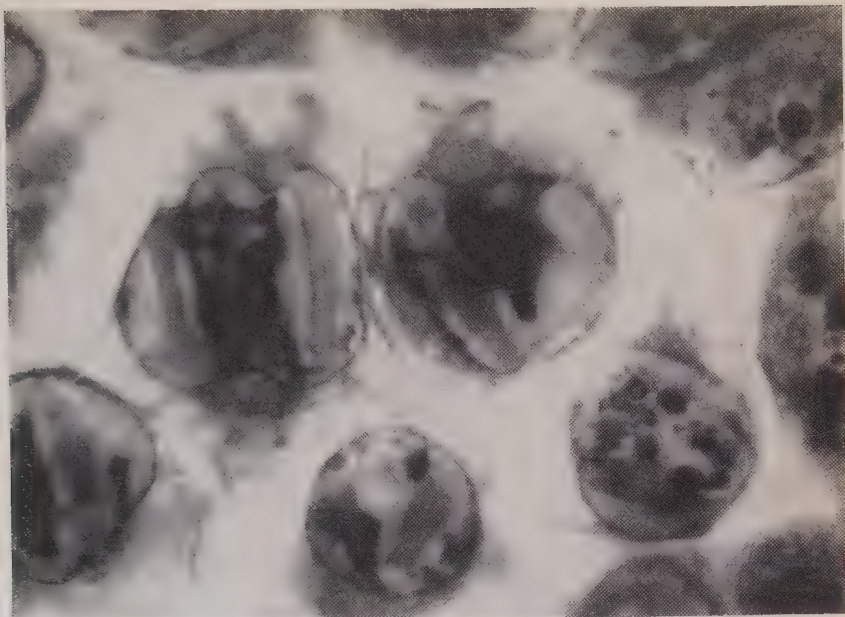


FIG. 3.

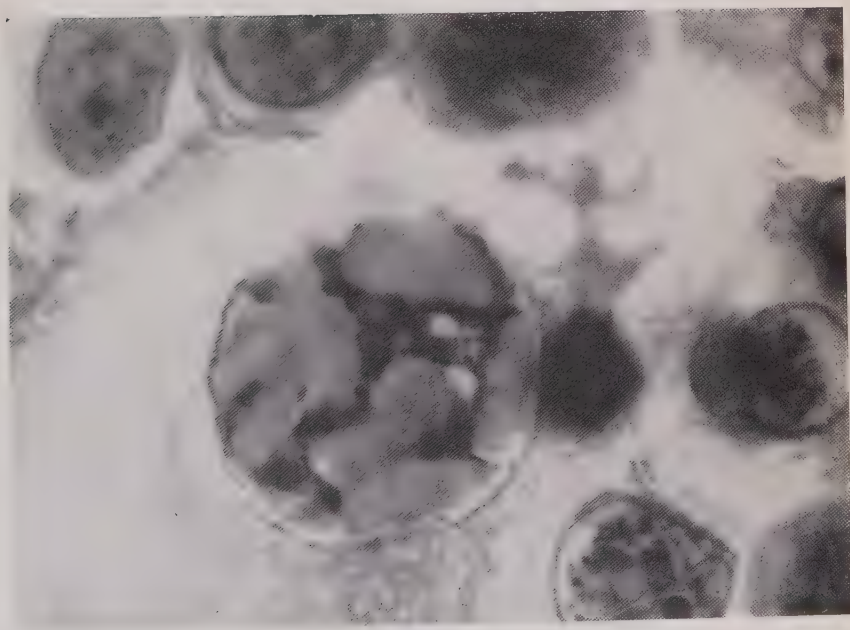


FIG. 4.

### PLANCHE III

FIG. 5. — Cellules T à l'état frais, infectées par un adénovirus du type 5 depuis trois jours. Contraste de phase.

FIG. 6. — Cellules T, infectées par un adénovirus du type 5 depuis trois jours. Fixation au méthanol. Coloration hémalum-érythrosine. La substance éosinophile périphérique à différents stades de condensation est bien visible. C'est un foyer à un stade relativement précoce et on ne voit que peu de formations en barres.



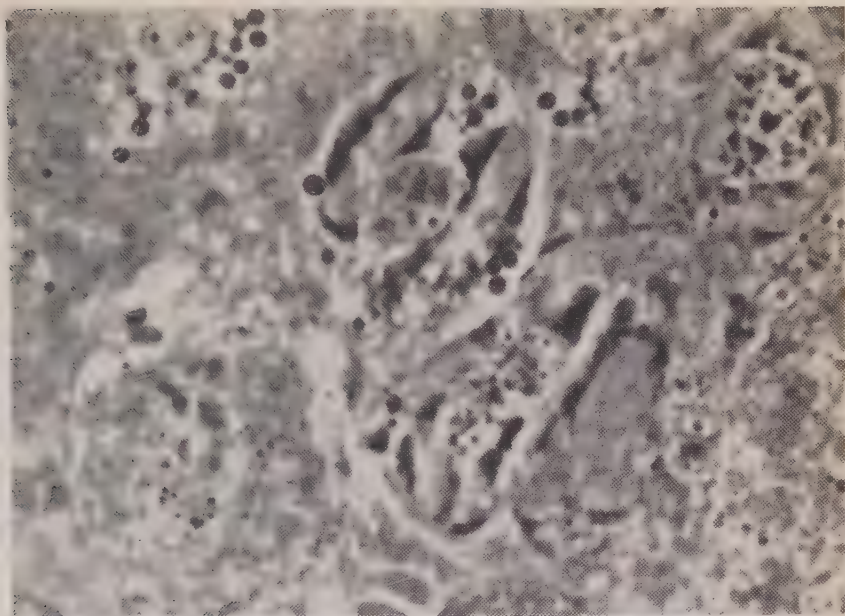


FIG. 5.



FIG. 6.

PLANCHE IV

FIG. 7 et 8. — Thyroïde humaine de première explantation infectée par un adénovirus du type 5 depuis quarante-huit heures. Fixation au méthanol ; coloration hémalum-érythrosine.



FIG. 7.

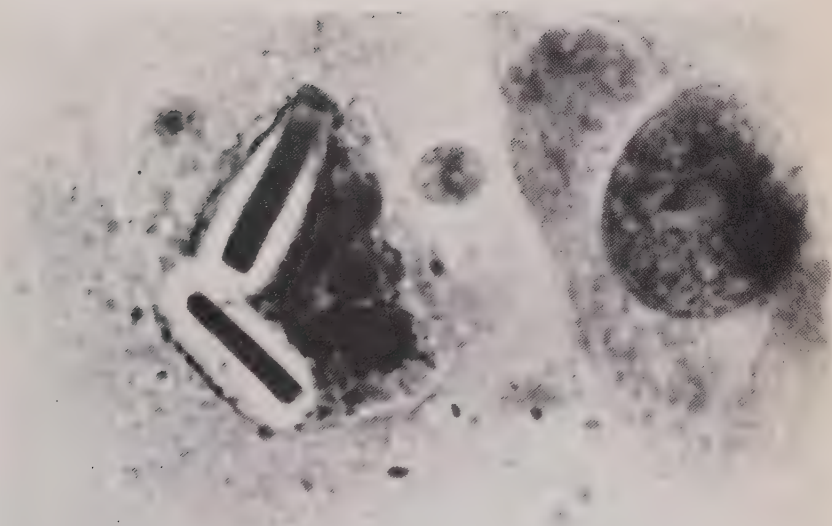


FIG. 8.



## LA RÉACTION DE FIXATION DU COMPLÉMENT POUR UN DIAGNOSTIC PRÉCOCE DE LA POLIOMYÉLITE

par Jacqueline VIRAT (\*).

(Institut Pasteur, Service des Virus [D<sup>r</sup> P. LÉPINE])

Des 468 réactions de fixation du complément qu'il nous a été donné de faire pendant le deuxième semestre 1959, nous n'avons retenu, pour cette étude, que celles qui avaient pu être accompagnées d'un essai d'isolement de virus sur cultures cellulaires (cellules de rein de singe *Cynocephalus babuin*).

Il est à regretter toutefois que nous n'ayons pu faire le plus souvent qu'une étude qualitative, le volume d'antigène disponible restant trop limité pour un titrage complet des anticorps.

Il ne nous a pas non plus été toujours possible de comparer deux échantillons de sérum d'un même malade. Nous nous proposons d'ailleurs de discuter à la fin de cette étude la valeur de ces échantillons.

Notre étude a été faite avec des antigènes préparés selon deux méthodes, chacune utilisant la multiplication des virus poliomyélitiques en culture de cellules de souche (cellules KB). Ce sont :

a) L'antigène résultant de la concentration du liquide de culture cellulaire au moment de l'inoculation du virus et prélèvement du liquide surnageant après trois passages successifs. Le liquide, après centrifugation à 2 500 t/mn, est chauffé à 50° et utilisé comme antigène (Maurin [2]).

b) L'antigène préparé selon la technique de F. Artzet [1] : les cultures cellulaires sont prélevées vingt et une heures environ après l'inoculation massive de virus, au moment où toutes les cellules sont détruites. Le culot de centrifugation est repris dans un volume de diluant 40 fois moindre que le volume initial de milieu ; après six congélations et décongélations successives le tout est centrifugé : le surnageant constitue l'antigène.

Nous n'utilisons plus actuellement que cette dernière méthode, plus simple que la précédente.

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 2 mars 1961.



Nos recherches concernant l'utilisation d'un antigène concentré par précipitation ne nous ont pas encore donné de résultats utilisables en pratique.

Chaque réaction est faite en présence d'un témoin de l'antigène préparé à partir de cultures cellulaires sans virus.

Les sérums utilisés pour le titrage des antigènes sont des sérums de malades fixant le complément à la dilution 1/64 au moins.

En présence de ces sérums, le titre des antigènes varie, selon les cas, entre 4 et 8 unités. Exceptionnellement, nous avons obtenu des antigènes titrant 16 unités.

La technique de fixation du complément que nous avons employée est la même que celle que nous utilisons pour nos réactions de routine avec les autres antigènes viraux : réaction

TABLEAU I.

	Isolement d'un virus	Pas d'isolement de virus
P.C. Positive	103 84,4 %	49 30,2 %
P.C. Négative	19 15,6 %	113 69,7 %
	122	162

type Kolmer en présence de 2 unités de complément et 3 unités de sérum hémolytique. Les hématies de mouton sont à la concentration de 2 p. 100 (à partir du culot). Le diluant utilisé est préparé selon la technique de Mayer légèrement modifiée.

Pendant le deuxième semestre de 1959, nous avons, soit dans des syndromes paralytiques, soit dans des syndromes méningés, simultanément tenté l'isolement d'un virus et pratiqué la réaction de fixation du complément avec les antigènes poliomyélitiques, chez 284 malades.

Pour un nombre plus important de malades, nous avons fait, soit la réaction sérologique seule, soit l'isolement de virus seul ; les résultats obtenus n'entrent pas dans cette statistique.

Les résultats globaux de nos essais ainsi définis sont consignés dans le tableau I.

D'après ce tableau, nous constatons que la réaction de fixation du complément positive correspond à l'isolement d'un virus poliomyélitique dans 84,4 p. 100 des cas. La réaction fait donc défaut dans 15,6 p. 100 des cas, soit que le virus poliomyélitique isolé ne soit pas à l'origine de l'affection, soit que le titre des anticorps fixant le complément soit trop faible pour être mis en évidence.

#### APPARITION DES ANTICORPS.

Nous constatons, avec Melnick [3] d'une part et avec Svedmyr et coll. [5] d'autre part, que les anticorps sont décelables très précocement dans le sérum ; nous entendons par sérum précoce

TABLEAU II.

Dates des prélèvements	Fixation du complément			Virus isolé	
	Type I	Type II	Type III		
Pal...8 jours 1) 1 mois	32 8	16 ≤8	≤8 ≤8	I	
Pau...6 jours 2) 23 jours	8 ≤8	16 ≤8	32 32	III	
Fli...6 jours 26 jours 3) 1 mois	32 6 ≤8	≤8 ≤8 ≤8	8 ≤8 ≤8	I	
Cesb...4 jours 4) 3 sem.	8 ≤8	8 ≤8	16 ≤8	I	
All...8 jours 5) 4 sem.	≤32 ≤32	≤32 ≤32	≤32 ≤32	III	
Gast...6 jours 4 sem. 6) 7 sem.	64 64 32	128 64 32	64 128 32	III	
Zur...2 jours 7) 1 mois	≤8 ≤8	≤8 ≤8	128 64	I	
Bou...2 jours 8) 22 jours	8 ≤8	32 16	≤8 ≤8	II	
Car...2 jours 9) 26 jours	16 ≤8	64 ≤8	32 ≤8	III	
En...4 jours 7 jours 10) 1 mois	≤8 ≤8 ≤8	32 32 16	≤8 ≤8 ≤8	II	
Thi...19 jours 11) 1 mois	32 8	16 8	64 64	III	
Del...3 jours 24 jours 12) 45 jours	≤8 8 8	16 64 32	64 64 64	II	affection ourlienne concomi- 1e sérum 1/5 tante 2e sérum 1/80
Chom...13 jours 13) 45 jours	8 ≤8	≤8 ≤8	≤8 ≤8	III	
Sou...8 jours 14) 21 jours	≤8 16	≤8 ≤8	≤8 ≤8	I	
Dard... ? 15) 21 jours	≤8 ≤8	≤8 ≤8	≤8 ≤8	II	

le sérum prélevé dans la semaine suivant l'apparition, soit de paralysies, soit d'un syndrome méningé, le début de l'affection étant théoriquement antérieur à ces signes.

C'est ainsi, que, chez un enfant dont les selles et le sérum ont été recueillis le jour qui a suivi l'apparition des signes méningés, le titre des anticorps vis-à-vis des antigènes de type I et III était égal ou supérieur à 16, alors qu'un virus poliomyélitique de type I était isolé des selles.

Pour une série de malades chez lesquels un virus de type III a été isolé, les prélèvements de sérum ont été faits le 5<sup>e</sup> ou le 6<sup>e</sup> jour après l'apparition des signes cliniques (méningés ou paralytiques). Le titre des anticorps de type III était au moins égal à 16 chez tous les malades. Malheureusement, dans ce cas, l'évolution des anticorps n'a pu être suivie faute d'un deuxième prélèvement de sérum.

Sur les 284 cas chez lesquels les réactions sérologiques ont été pratiquées, nous n'en avons trouvé que trois où le sérum précoce était négatif, alors que celui prélevé trois semaines après, avait un titre égal à 16 vis-à-vis de l'antigène homologue (type I) pour le premier et à 8 pour le second (type II) (sérum 14 et 15 du tableau II). Le troisième avait des anticorps à un titre égal à 16 vis-à-vis des trois types de virus (isolement d'un virus de type I).

#### EVOLUTION DES ANTICORPS.

Nous en donnons quelques exemples dans le tableau II et nous pensons que les résultats indiqués montrent l'impossibilité où l'on se trouve d'établir une règle définitive concernant la courbe des anticorps fixant le complément dans la poliomyélite clinique.

C'est ainsi que chez certains malades (sérum 1, 3, 4, 9) les anticorps présents dès le début de la maladie ont disparu dès la fin du premier mois. Chez d'autres par contre, (sérum 2, 5, 6, 11, 12) les anticorps sont encore présents à un titre élevé un mois et même sept semaines après le début de la maladie.

Même si nombre de sérums sont encore positifs après un mois, nous pensons qu'il ne nous est pas permis d'accepter un sérum prélevé à cette date pour un diagnostic rétrospectif de poliomyélite : 30 p. 100 de sérums environ sont devenus négatifs à cette date.

Nous attirons l'attention sur un cas particulièrement intéressant (sérum 12 du tableau II). Dans le sérum précoce prélevé trois jours après l'apparition des paralysies les anticorps de types II et III étaient présents à un taux égal à 16 pour le premier, à 64 pour le deuxième, alors qu'un virus poliomyélitique de type II était isolé des selles. Nous avons constaté une augmentation des

anticorps homologues (x 4) dans le sérum prélevé vingt-quatre jours après le début de l'affection. Pendant son hospitalisation, l'enfant a fait en plus une varicelle banale au décours de laquelle on a diagnostiqué, à la faveur d'un clocher fébrile, une méningite lymphocytaire à 910 éléments. L'origine ourlienne de cette nouvelle affection a pu être confirmée par les réactions sérologiques.

#### SPÉCIFICITÉ DE LA RÉACTION.

Schmidt et Lennette [4] avaient établi que, non chauffés, les liquides de cultures (cellules HeLa), agissaient comme antigènes spécifiques ; chauffés (30 mn à 55°), le titre diminuerait et la réaction deviendrait hétérotypique.

Tant que nous avons employé les antigènes préparés selon notre première méthode, ceux-ci ont été chauffés pour que disparaissent à la fois le pouvoir pathogène et le pouvoir anticomplémentaire. Il ne nous a donc pas été permis d'établir une comparaison entre antigènes chauffés et non chauffés, ceux-ci ne pouvant être employés à cause de leur pouvoir anticomplémentaire. Par contre, les antigènes obtenus à partir de culots cellulaires ne sont pas anticomplémentaires, mais le chauffage de ces antigènes ne change en rien les résultats obtenus. Il nous semble plus logique d'admettre, plutôt que l'absence de spécificité des antigènes, la présence de plusieurs types d'anticorps dans certains sérums.

*Influence du moment* auquel est prélevé le sérum sur la spécificité de celui-ci.

Dans le tableau II, chez les malades 1, 2 et 8, il ne persiste, dans les sérums prélevés après trois semaines que les anticorps homologues. Chez le malade 11, les anticorps homologues (type III) subsistent à un taux nettement plus élevé que les anticorps hétérologues dans le sérum tardif, alors que dans le sérum précoce, ceux-ci sont présents à un titre élevé.

Nous nous devons de noter, chez certains malades l'absence d'anticorps homologues, alors que sont présents un et plus rarement deux types d'anticorps hétérologues (sérums 7 et 13, tableau II).

*La spécificité des sérums est-elle l'apanage des jeunes enfants ?*

Dans le tableau III nous avons réuni quelques sérums d'enfants entre 7 mois et 12 ans. Nous faisons les constatations suivantes :

1° Les 2 enfants de 7 et 8 mois ont des anticorps vis-à-vis des 3 types de virus.

2° Les enfants de 10 mois, 20 mois et 2 ans ont des anticorps vis-à-vis des 3 types de virus dans le sérum précoce, mais avec une nette prépondérance des anticorps homotypiques.

3° Les enfants entre 6 et 12 ans ne montrent pas, sauf un, un titre d'anticorps plus élevé vis-à-vis des virus homologues.

Des résultats qui précèdent nous ne tirerons pas de conclusions, mais seulement des hypothèses, le nombre de sérums étudiés étant manifestement insuffisant.

Le cas des bébés de 6 et 7 mois reste à discuter. Une des hypothèses que nous nous permettons est l'existence d'un phénomène d'entraînement d'un reliquat d'anticorps maternels.

Les enfants entre 10 mois et 2 ans n'ont pas été en contact avec le virus poliomyélitique et leur rencontre avec ce virus se traduit par une apparition des anticorps homologues.

Après 2 ans, les enfants ont plus de chance d'avoir été en contact avec un ou deux types de virus et il se produirait, à la faveur d'une infection massive par un des types, une réaction anamnétique.

TABLEAU III.

Ages	Fixation du complément			Virus isolé
	Type I	Type II	Type III	
Gil... 2 ans %	<8	<8	≥32	III
Rem... 2 ans %	16 8	8 <8	64 16	III
Loz... 8 mois	≥32	≥32	32	II
Del... 7 mois	≥32	≥32	≥32	0
Deu... 3 ans	32	16	32	I
Vog... 2 ans	32 32	8 8	8 8	I
Lec... 20 mois	<8	<8	32	III
Lou... 10 mois	<8	≥32	<8	II
Bel... 6 ans	32	≥32	32	I
Es... 7 ans	32 16	8 <8	8 <8	I
Mor... 6 ans	32	16	16	I
Bel... 10 ans	32	≥32	32	I
Br... 12 ans	32	32	32	I
Dor... 2 ans %	<8 <8	<8 8	<8 8	II



## FAUSSES RÉACTIONS POSITIVES.

Vingt sérums de malades atteints d'affections respiratoires, pris comme témoins ont tous été négatifs.

La réaction a été également négative avec le sérum de trois malades chez lesquels a été isolé un entérovirus non poliomyélique.

Mais chez un quatrième malade atteint de méningite lymphocytaire et chez lequel un virus Coxsackie A9 a été isolé, la réaction était positive avec les antigènes de types I et III. Il est à signaler que le malade avait été récemment vacciné contre la poliomyélite.

Il nous a été donné depuis, et ces sérums ne font pas partie de ceux étudiés dans ce travail, de trouver quelques réactions positives vis-à-vis des antigènes poliomyélitiques alors qu'un entérovirus non poliomyélique était isolé des selles des malades. Nous nous proposons d'examiner plus tard ces résultats non spécifiques.

Dans la plupart des réactions sérologiques concernant les affections à virus, il est indispensable d'étudier comparativement un sérum prélevé dès les premiers jours de l'affection et un sérum prélevé à partir du 15<sup>e</sup> jour environ.

Dans la poliomyélite nous avons vu que le prélèvement précoce n'était guère possible, la phase initiale de la maladie étant la plupart du temps attribuée à une cause banale ; le premier prélèvement sanguin est fait quelques jours après l'apparition des paralysies ou des signes méningés et, sur 284 malades, 3 seulement n'avaient pas d'anticorps dans le sérum considéré comme précoce. On devrait donc pouvoir admettre, contrairement à ce qui est habituel, qu'un seul échantillon de sérum prélevé dans les quinze premiers jours après l'apparition des signes cliniques est suffisant pour établir la suspicion de la maladie par la méthode de fixation du complément.

Les résultats étant en concordance dans 84,4 p. 100 des cas, ils nous autorisent à pratiquer de façon courante cette réaction.

## RÉSUMÉ.

La fixation du complément avec les antigènes poliomyélitiques a été pratiquée pour 284 malades chez lesquels l'essai d'isolement d'un virus était également tenté.

La réaction positive accompagne l'isolement du virus dans 84,4 p. 100 des cas. La spécificité et l'évolution des anticorps sont étudiées.

## SUMMARY.

## THE COMPLEMENT FIXATION REACTION IN VIEW OF AN EARLY DIAGNOSTIC OF POLIOMYELITIS.

The complement fixation reaction with poliomyelitic antigens was carried out in 284 patients; at the same time, the stools of these patients were examined for the presence of a virus.

A positive complement fixation reaction is associated with isolation of virus in 84,4 % of the cases. The specificity and evolution of antibodies are studied.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] ARTZET (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **99**, 852.
  - [2] MAURIN (J.), CARRÉ (M. C.) et VIRAT (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **98**, 211.
  - [3] MELNICK (J. L.), Mc CARROL (J. R.) and HORSTMANN (D. M.). *Amer. J. Hyg.*, 1956, **63**, 95.
  - [4] SCHMIDT (N. I.) and LENNETTE (E. H.). *J. exp. Med.*, 1956, **104**, 99.
  - [5] SVEDMYR (A.), MELEN (B.) et KJELLEN (L.). *Acta med. scand.*, 1956, **154**, 20.
-

# SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15°)

Séance du 4 mai 1961.

Présidence de M. Robert FASQUELLE.

---

## UN NOUVEL ANTIGÈNE SOMATIQUE DES *SALMONELLA*

par L. LE MINOR, P. LE NOC et D. DRÉAN.

(Instituts Pasteur de Paris et de Madagascar)

Dans les nouveaux sérotypes de *Salmonella* qui sont décrits, on observe en général une association nouvelle d'antigènes somatiques et flagellaires déjà connus. Il est bien plus rare de trouver de nouveaux antigènes.

La *Salmonella* qui fait l'objet de cette note a été isolée par copro-culture chez un caméléon, lors d'une enquête systématique sur la présence des Entérobactéries pathogènes chez ces reptiles à Tranoroa dans le sud de Madagascar.

Elle ne possède pas d'uréase, ne cultive pas sur milieu de Braun au CNK, réduit les nitrates en nitrites, produit de l'H<sub>2</sub>S. Sur milieu de Clark et Lubs, la réaction au rouge de méthyle est positive, celle de Voges-Proskauer négative. La recherche de l'indole sur milieux au tryptophane est négative. Elle fait fermenter les oses ou alcools suivants : xylose, arabinose, rhamnose, glucose (+ gaz), mannitol, sorbitol, dulcitol, maltose, tréhalose. Adonitol, sorbose, lactose, saccharose, inositol et salicine ne sont pas fermentés. Cette *Salmonella* liquéfie en quatre jours la gélatine de Kohn-Lautrop et ne fait pas fermenter le D-tartrate de sodium. Elle appartient donc au sous-genre II de Kauffmann [4]. Elle cultive sur milieu synthétique de Simmons au citrate de sodium.

Cette culture (vivante et chauffée deux heures à 100° pour éliminer un éventuel antigène de surface thermolabile) n'était agglutinée ni sur lames, ni en tubes à la dilution de 1/100 par aucun des sérums anti O correspondant aux antigènes reconnus, lorsque nous l'avons étudiée (O : 1 à O : 52). Etant sous forme S, cette *Salmonella* possédait donc vraisemblablement un nouvel antigène O. Pour le confirmer, nous avons préparé avec elle un sérum de lapin qui agglutinait à 1/6 400 la suspension O de notre culture. Nous avons titré dans ce sérum les suspensions correspondant à tous les groupes O du schéma de Kauffmann, White. Aucune n'y fut agglutinée à un titre égal ou supérieur à 1/100, sauf celle de *S. utrecht* (O : 52) qui était agglutinée à 1/400. Les suspensions O de *S. humber* (O : 53), *S. uccele* (O : 54) et *S. artis*

(O : 56) qui nous furent ultérieurement adressées par le professeur Kauffmann ne sont pas non plus agglutinées par ce sérum. Le Dr Edwards, à qui cette culture fut adressée, trouva qu'elle était légèrement agglutinée par un sérum *Arizona* O : 8. Nous avons confirmé ce fait : la suspension O : 8 d'*Arizona* est agglutinée à 1/200 par notre sérum.

L'antigène O de cette culture est donc un nouvel antigène O qui n'a pas de rapports avec les antigènes O déjà connus de *Salmonella* et d'*Arizona*, à l'exception de rapports mineurs avec O : 52 *Salmonella* et O : 8 *Arizona*. Le professeur Kauffmann, Directeur du Centre International des *Salmonella* et *Escherichia*, lui a attribué le numéro 55.

L'antigène flagellaire est diphasique. Agglutinée au départ par le sérum anti  $z_{39}$ , la culture en présence de ce sérum devient agglutinable par le sérum anti  $k$ .

En tubes, la phase  $z_{39}$  est agglutinée au titre homologue (1/25 600) par le sérum préparé au moyen de *S. springs*. La saturation de ce sérum par notre culture laisse un résidu important d'agglutinines homologues (1/6 400). Inversement, notre sérum, qui agglutine la suspension  $z_{39}$  homologue à 1/12 800, n'agglutine qu'à 1/1 600 la suspension  $z_{39}$  de *S. springs*. Après saturation par *S. springs*, les agglutinines  $z_{39}$  homologues conservent un titre de 1/3 200. L'antigène  $z_{39}$  n'est donc pas identique à celui de *S. springs*.

La phase  $k$  est agglutinée à 1/6 400 dans le sérum anti *S. thompson* phase 1 (titre homologue 1/25 600). La saturation par *S. tranoroa* fait baisser le titre des agglutinines  $k$  homologues à 1/3 200. Inversement dans le sérum anti *S. tranoroa*, la phase  $k$  homologue est agglutinée à 1/12 800, la phase  $k$  de *S. thompson* à 1/1 600. La saturation par *S. thompson* phase 1 laisse subsister un titre d'agglutinines homologues de 1/3 200. L'antigène  $k$  n'est donc pas identique à celui de *S. thompson*.

La formule de ce nouveau sérotype est donc 55 :  $k$  :  $z_{39}$ .

RÉSUMÉ. — Description d'un sérotype de *Salmonella* (*S. tranoroa*) possédant un nouvel antigène O (55 :  $k$  :  $z_{39}$ ).

## SUMMARY

### A NEW SOMATIC ANTIGEN IN *Salmonella*.

Description of a new *Salmonella* serotype (*S. tranoroa*) possessing a new O antigen (55 :  $k$  :  $z_{39}$ ).

★ ★

Nous remercions le professeur Kauffmann d'avoir confirmé nos résultats.

## BIBLIOGRAPHIE

[1] KAUFFMANN (F.). *Acta path. microb. scand.*, 1960, 49, 393.

## UNE NOUVELLE ESPÈCE DE *SALMONELLA* : *S. TOURNAI* (3,15 : y : z<sub>6</sub>)

par E. van OYE, L. LE MINOR et J. MOINET.

(Institut d'Hygiène et d'Epidémiologie [Bruxelles],  
Institut Pasteur [Paris] et Institut Médico-chirurgical [Tournai])

La nouvelle espèce de *Salmonella* que nous décrivons ci-après a été isolée à Tournai, ville située au sud-ouest de la Belgique. Elle a été trouvée chez une fillette de 3 mois et demi qui présentait un tableau clinique fort discret mais tenace, se résumant en une perte de poids et l'émission de selles molles. Ce n'est qu'à la troisième coproculture que *Salmonella tournai* a été isolée.

Il s'agit d'un bacille Gram-négatif, mobile, à cils péritriches, qui se développe sur les milieux utilisés avec les caractères cultureux classiques d'une *Salmonella*. Il possède les propriétés biochimiques suivantes : fermentation (en vingt-quatre heures et avec production de gaz) de l'arabinose, de la dulcité, du glucose, du lévulose, du maltose, de la mannite, du rhamnose, de la sorbite, du tréhalose et du xylose. L'adonite, l'inosite, le lactose, le raffinose, le saccharose, la salicine et le sorbose ne sont pas fermentés. La production de H<sub>2</sub>S est abondante. Il n'y a ni production d'indole, ni hydrolyse de l'urée, ni liquéfaction de la gélatine. La réaction de Voges-Proskauer est négative, celle au rouge de méthyle est positive. Il n'y a pas de développement dans un milieu contenant du KCN. La culture possède une lysine-décarboxylase mais pas de tryptophane-désaminase ; elle ne transforme pas la phénylalanine en acide phénylpyruvique. Les nitrates sont réduits en nitrites. L'action sur les sels d'acides organiques est la suivante : D-tartrate +<sup>1</sup>, L-tartrate +<sup>1</sup>, I-tartrate +<sup>2</sup>, citrate +<sup>1</sup>, mucate +<sup>1</sup> et malonate —.

La détermination de la structure antigénique de ce germe n'a guère présenté de difficultés. La culture est agglutinée sur lames par le sérum anti-O polyvalent du groupe sérologique E, ainsi que par le sérum anti-O : 15 pur. Les sérums anti-O : 10, O : 19 et O : 34 restent sans effet.

L'antigène flagellaire de la phase 1 est agglutiné par le sérum anti-H : y à l'exception de tout autre. L'antigène flagellaire de la phase 2 est agglutiné légèrement par le sérum anti-H : 1,5 non absorbé, mais il ne l'est plus par un sérum anti-H : 5 pur. D'autre part il est fortement agglutiné par le sérum anti-H : z<sub>6</sub>, même si ce dernier a été épuisé par un antigène H : 1,5.

Ces résultats ont été confirmés par des réactions d'agglutination en tubes qui ont démontré que la culture est agglutinée jusqu'au titre par les sérums anti-O : 3,15 (sérum *S. newington*, titre 1/6 400),



anti-H : y (sérum *S. mikawasima*, titre 1/12 800) et anti-H : z<sub>6</sub> (sérum *S. kentucky*, titre 1/25 600). Non seulement *S. tournai* est agglutinée au titre par ces différents sérums, mais elle en absorbe également complètement les agglutinines.

La formule antigénique est donc : 3,15 : y : z<sub>6</sub>.

Il faut noter ici que la structure antigénique de *S. tournai* est très proche de celle de *S. binza* (3,15 : y : 1,5), et cela d'autant plus que les antigènes H : z<sub>6</sub> et H : 1,5 possèdent un facteur commun.

RÉSUMÉ. — Description d'une nouvelle espèce de *Salmonella*, *S. tournai* (3,15 : y : z<sub>6</sub>), isolée par coproculture chez une petite fille de 3 mois et demi qui souffrait de troubles gastro-intestinaux bénins

#### SUMMARY.

A NEW *Salmonella* SPECIES : *S. tournai*.

Description of a new *Salmonella* species, *S. tournai* (3,15 : y : z<sub>6</sub>) isolated from the stools of an infant, three and a half months old, who suffered from a light intestinal disorder.

★ ★

Nous tenons à remercier le professeur F. Kauffmann, Directeur du Centre International des *Salmonella* à Copenhague, qui a contrôlé la culture de *S. tournai* et confirmé notre détermination.

## RECHERCHES SUR LES ODEURS DÉGAGÉES PAR LES ANAÉROBIES

### III. *CLOSTRIDIUM HISTOLYTICUM*

par A. FRANGOPOULOS et C. BILLY.

(Institut Pasteur, Service des Anaérobies)

Dans le cadre des recherches sur les odeurs dégagées par les anaérobies, et à la suite d'études déjà effectuées sur des Clostridiales : *Inflabilis lacustris* (Prévot et Sarraf [4]) et *Clostridium corallinum* (Billy et Prévot [1]), nous avons retenu le cas de *Cl. histolyticum*.

Il est communément admis que *Cl. histolyticum* (Weinberg et Séguin) est un germe producteur d'« œdème disséquant et histolyse totale » (Prévot [3]). Chez le cobaye, la gangrène entraîne la mort en un à deux jours par myolyse.

Comparant ce germe avec de nombreux *Clostridium* aux cultures particulièrement fétides, nous avons remarqué le caractère assez peu malodorant des souches de *Cl. histolyticum* en culture. Nous avons voulu savoir si ce caractère était lié à la présence d'une quantité d'amines plus faible que celle contenue dans les cultures de Clostridiales étudiées jusqu'alors.

MÉTHODE D'ÉTUDE. — La méthode de recherche des amines fixes et volatiles mise au point par Blass et Sarraf [2] a été appliquée aux huit souches que comporte la collection du Service des Anaérobies. Les cultures en bouillon VF glucosé ont été distillées après six à neuf jours d'incubation à 37° C. Les résidus de distillation ont été étudiés par l'électrophorèse. Les distillats l'ont été par la chromatographie.

RÉSULTATS. — En dehors de traces d'isobutylamine présentes dans une seule souche, aucune amine volatile n'a pu être décelée par l'analyse chromatographique.

Par contre, l'électrophorèse des résidus de distillation a révélé l'existence d'une amine fixe présente dans toutes les souches : la putrescine. Cette amine se forme à pH acide par décarboxylation de l'ornithine.

Tableau des amines produites par *Cl. histolyticum*.

SOUCHES	NOMBRE DE JOURS D'ÉTUDE	pH FINAL	TYRAMINE	HISTAMINE	PUTRESCINE	CADAVÉRINE	TRYPTAMINE	NEURINE	ALCOYLAMINES
Chx . .	8	5			++				
A 53 .	9	4			++				
A 54 .	6	4			++				
Tro2E	9	4,5	traces	traces	++				
973 . .	9	3,5			++				
114C .	6	5	traces	traces	++				
1196 .	6	4,5	traces		++				traces
1528 .	6	5		traces	++				

Les quantités de putrescine ont été évaluées par méthode visuelle directe, c'est-à-dire par comparaison de taches de résidus de distillation avec des taches témoins d'une solution de putrescine 0,01 M, déposées sur le papier d'électrophorèse selon des quantités croissantes.

Cette méthode, moins précise que l'évaluation spectrophotométrique, a permis cependant de souligner la constance des quantités de putrescine produites par chaque souche après six à neuf jours de culture. La moyenne en est de 510 mg par litre.

Outre la putrescine, on peut signaler la présence de traces de tyramine dans quelques souches seulement (voir tableau I).

CONCLUSION. — Il est permis de penser que si les Clostridiales précédemment étudiées ont en culture une odeur particulièrement fétide, elles la doivent à la production de quantités importantes de scatole, d'indole, de  $\text{SH}_2$  et d'amines fixes et volatiles.

*Clostridium histolyticum* ne fournit que des traces d'indole et le caractère très légèrement fétide de ses cultures s'explique par la présence de la putrescine, amine de décarboxylation qui se forme de façon constante.

Les huit souches étudiées offrent sensiblement le même caractère assez peu malodorant.

#### SUMMARY

STUDIES ON THE SMELLS EMITTED BY ANAEROBIC BACTERIA :

*Cl. histolyticum*.

The cultures of Clostridiales studied in the authors' previous papers emit a fetid smell. The results of the experiments suggest that this smell is due to the high amounts of scatol,  $\text{SH}_2$  and fix volatil amines produced by the cultures.

*Cl. histolyticum* produces only traces of indol. The lightly fetid smell of its culture is due to the presence of putrescin, amine of decarboxylation, which is constantly formed.

The eight strains studied present the same lightly ill-smelling character.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BILLY (C.) et PRÉVOT (A.-R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, **100**, 475.
- [2] BLASS (J.) et SARRAF (A.). *J. Chromat.*, 1960, **3**, 168.
- [3] PRÉVOT (A.-R.). *Manuel de détermination des Anaérobies*, 3<sup>e</sup> édit., Masson, édit., Paris, 1957, 220.
- [4] PRÉVOT (A.-R.) et SARRAF (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **99**, 629-653.

---

#### LIVRES REÇUS

E. Berger, J. L. Melnick et coll. — *Progress in medical virology*, 1 vol., 496 p., 24 × 18 cm, S. Karger, édit., Bâle, New York, 1961. Prix : 69 NF.

Ce volume, le troisième de la collection, n'est pas inférieur en intérêt aux autres, au contraire.

Suivant une formule qui tend à remplacer la publication des traités d'ensemble, rapidement démodés, chaque volume apporte une succession de mises au point sur les questions de virologie qui ont bénéficié des plus grands progrès dans l'intervalle des publications ; ce qui a

l'avantage d'apporter au lecteur des travaux d'un intérêt certain, ainsi qu'une bibliographie de questions dont la revue générale est faite par l'un des travailleurs les plus compétents en la matière. J'avoue personnellement ne voir aucun inconvénient à la présentation disparate des sujets traités, dont l'intérêt et l'actualité sont le principal attrait.

Nathalie Schmidt et E. Lennette exposent les progrès récents dans le sérodiagnostic des infections à virus. Leur article, envisagé dans un esprit technique et encyclopédique, occupe 25 pages. Il est très complet mais on ne saurait reprocher aux auteurs de ne pas apporter des vues vraiment révolutionnaires sur le sujet dont le chapitre le plus nouveau, celui de la microscopie en fluorescence, est traité plus complètement dans un autre article du même volume.

W. C. Reeves consacre une courte mais excellente étude à la conservation dans la nature des virus Arbor pendant la phase hivernale où manquent les insectes piqueurs. Il touche là à des problèmes à la fois théoriques et pratiques d'une grande importance.

G. Poetchke nous donne un article copieux et très largement documenté sur la microscopie en fluorescence au moyen des anticorps marqués et leur application à l'étude des antigènes et anticorps viraux. Ce sujet a pris une telle importance depuis deux ans que l'article constitue une mise au point qui vient à son heure. C'est le seul article qui soit rédigé en allemand.

Le chapitre suivant, par C. Herrmann, est consacré à l'essai chimiothérapique des médicaments antiviraux. Il donne la technique générale suivie au moins par certains laboratoires des U. S. A. pour faire le « screening » des substances nouvelles. Une large part du travail est donnée aux essais *in vitro*; l'expérience montre malheureusement que les résultats obtenus ainsi sont le plus souvent loin de correspondre à une activité utile *in vivo*.

H. Gelfand fait une revue générale de l'épidémiologie des virus Cocksackie et ECHO, question dont l'intérêt est brûlant et que 50 pages de texte n'arrivent pas à épuiser : c'est là vraiment un article de documentation fondamentale.

Nous trouvons dans l'article suivant, par A. Smorodintsev, des renseignements sur les recherches, principalement des auteurs soviétiques, concernant la vaccination au moyen des vaccins vivants atténués contre la poliomyélite, les oreillons et la rougeole. Soigneusement rédigé et très documenté, cet article apporte une somme d'informations en général difficilement accessibles au lecteur occidental et qu'il est agréable de trouver ainsi réunies. Les références données sont essentiellement celles des travaux des auteurs soviétiques, ce qui à la fois en souligne l'intérêt mais limite le caractère général de l'étude.

Le sujet très discuté et très actuel du rôle des virus dans l'étiologie des malformations congénitales est traité par R. Blattner et Florence Heys qui ont fait non seulement une revue générale mais apportent des arguments d'ordre expérimental du plus haut intérêt.

Le dernier article, de beaucoup le plus important par l'étendue puisqu'il comprend plus de 140 pages et 435 références bibliographiques, est celui que L. Dmochowski a consacré à l'étiologie virale de la leucémie. C'est dire le soin que l'auteur a apporté à traiter une question

sur laquelle une masse considérable de travaux a vu le jour au cours des dernières années. En fait, il analyse non seulement les travaux de Gross et ceux qui lui ont fait suite, mais il reprend l'ensemble du problème de tous les virus leucémogènes qui ont été décrits chez la souris et donne une excellente étude d'ensemble du virus du polyome.

Au total, l'intérêt des sujets traités est tel qu'il paraît difficile à quiconque veut se tenir au courant des progrès de la virologie, de se passer de ce volume tant pour sa documentation personnelle que pour compléter les références bibliographiques sur les sujets traités. La présentation de l'ouvrage est, comme pour les volumes précédents, impeccable avec d'excellentes illustrations, et les références bibliographiques copieuses comprennent les titres des articles, ce qui facilite les recherches.

P. L.

**Ch. Mattei.** — *Traitement actuel de la tuberculose pulmonaire en pratique médicale.* 1 vol., 410 p. + 112 p. d'iconographie. Masson, édit., Paris, 1961.

**M. Florkin.** — *Aspects of the origin of life.* 1 vol., 200 p., Pergamon Press, Oxford, Londres, New York, Paris, 1960. Prix : 30 s.

Cet ouvrage est composé des textes de vingt communications présentées au Symposium sur l'Origine de la Vie sur la Terre, qui s'est tenu à Moscou sous les auspices de l'Académie des Sciences d'U. R. S. S. La participation des savants soviétiques y est importante. Les exposés ont été sélectionnés pour donner à un public assez large un aperçu de l'orientation actuelle des recherches. L'apparition de la vie suppose la réalisation progressive de processus physicochimiques aboutissant à des produits de complexité croissante. Aussi, tandis que différents auteurs s'efforcent de préciser l'état initial de la terre, la nature des atmosphères planétaires et l'ensemble des conditions géologiques qui ont pu permettre l'apparition des plus simples molécules « organiques », d'autres parviennent à reproduire expérimentalement des synthèses d'acides-amino et à réaliser des liaisons peptidiques par des moyens physiques pseudo-naturels. Et simultanément on recherche la nature des forces qui confèrent aux macromolécules leurs propriétés d'autoduplication. Ce livre permet de mesurer les progrès encourageants réalisés depuis que l'expérimentation a succédé à la spéculation philosophique, mais aussi l'immensité du chemin qui reste à parcourir avant que puisse être reconstitué de façon convaincante l'historique de l'apparition de la vie sur la terre.

G. B.

**F. Reiff, I. R. Kautzmann, H. Lüers et M. Lindemann.** — *Die Hefen.* Vol. I. *Die Hefen in der Wissenschaft.* XXIV/1 024 p., 130 fig., 159 tabl. 19 × 27 cm, Verlag Hans Carl, Nuremberg, 1960. Prix : 168 DM.

Le domaine si étendu des levures, aussi bien en ce qui concerne la science pure que la pratique, leur a toujours conféré une importance capitale, et on pouvait s'étonner qu'aucun ouvrage d'ensemble



n'ait jusqu'ici réuni toutes les connaissances acquises à ce sujet. Le présent volume vient heureusement combler cette lacune. C'est le premier d'une série qui en comprendra deux. Il est consacré à l'étude scientifique des levures : biologie, morphologie, techniques de mise en évidence, systématique, cycles de développement, propriétés physiologiques, composition chimique, teneur en vitamines, en enzymes, métabolisme (du carbone, des protéines, des acides nucléiques, des lipides, etc.), emploi des levures dans l'alimentation et la thérapeutique. Chacun de ces chapitres est traité de façon approfondie par un spécialiste et envisage tous les aspects possibles de la question. L'ouvrage, d'une présentation très soignée, est abondamment illustré de nombreux tableaux et figures, et il constitue une véritable somme de tout ce que l'on peut savoir sur la question. Il intéressera non seulement les biologistes et microbiologistes, mais encore les généticiens, les chimistes, les techniciens de l'alimentation, et les industriels.

H. T.

**L. Rey et coll.** — *Traité de lyophilisation*. 1 vol., 416 p., 207 fig. Hermann, édit., 115, bd Saint-Germain, Paris (6<sup>e</sup>), 1960. Prix : 90 NF.

Il n'existait pas encore de traité de lyophilisation en langue française, cet ouvrage comble cette lacune. Il comprend environ 400 pages. Divisé en une vingtaine de chapitres il fait une revue de la théorie de ce procédé particulier de dessiccation, de l'appareillage qu'il met en œuvre, ainsi que des diverses applications pratiques qu'il a suscitées. Ces différentes parties étant judicieusement équilibrées, on pourra utilement s'y reporter, qu'il s'agisse de renseignements concernant les phénomènes physiques de la congélation, les phases de la dessiccation, les problèmes soulevés par la production du froid et la réalisation du vide, ou des applications pratiques. Les chapitres ayant trait aux bactéries, virus, parasites, tissus animaux et produits alimentaires montrent l'intérêt d'un tel ouvrage. Signalons également que la présentation matérielle du volume a été particulièrement soignée, avec de nombreuses figures et diagrammes en couleurs ; la plupart des chapitres comportent également des références bibliographiques qui ne donnent que plus de prix à ce traité.

P. B.

**M. Aron et P. Grassé.** — *Précis de biologie animale*. 6<sup>e</sup> édit., 1 vol., 1414 p., 770 fig., 2 pl. en couleurs. Masson et C<sup>ie</sup> édit., Paris, 1960. Prix : 60 NF.

Il s'agit de la sixième édition de ce Précis, destiné aux candidats de la licence ès sciences et aux étudiants en médecine. Paraissant moins de trois ans après la cinquième édition, elle ne comporte pas de modifications importantes. Le plan général a été maintenu. Cependant de nombreux chapitres ont été rédigés à nouveau ou complétés. Des adjonctions ont été introduites, en particulier on a complété l'étude des tissus par celle du sang, qui n'avait pas figuré dans les quatre premières éditions. L'ouvrage comprend de très nombreuses illustrations et, en outre, une table des matières détaillée et un index alphabétique très complet qui rendront de grands services.

H. T.

**E. J. Stokes.** — *Clinical Bacteriology*. 2<sup>e</sup> édit., 1 vol., 309 p., E. Arnold, édit., Londres, 1960. Prix : 30 s.

Dans ce livre, dont la présentation est excellente, sont exposées les principales applications de la bactériologie médicale courante. Des schémas et des photographies illustrent le texte où les caractères des principales bactéries sont sommairement rapportés.

Cet ouvrage pourra rendre service aux étudiants et à ceux qui commencent à étudier la bactériologie médicale. L. L.

*Epidemic goitre. Select bibliography and world distribution*. 2<sup>e</sup> édit., 1 vol., 136 p., Chilean Iodine Educational Bureau, Londres, 1960.

**P. F. Zdrodovskii et E. H. Golinevich.** — *The rickettsial diseases*. Edition anglaise du livre russe de 1956. Pergamon Press, New York et Londres, 1960. Prix : £ 5 5s.

Les auteurs russes, dans leur préface, se félicitent de cette collaboration médicale russo-anglo-américaine.

Cette édition comporte une mise à jour par rapport à l'édition russe de 1956.

Il s'agit d'une compilation, mais faite par les auteurs qui connaissent bien la question, et qui ont ajouté à la fin de l'ouvrage une bibliographie de 37 pages, qui cite beaucoup d'auteurs russes, mais donne les principales références internationales, dont un bon nombre de références françaises.

Le livre comporte 629 pages d'une excellente présentation. Après 200 pages de généralités, vient une étude détaillée des principales rickettsies, et la bibliographie suivie d'un index très pratique, le total constituant un bon manuel indispensable pour tout travailleur s'occupant de ces questions.

Les auteurs proposent, après avoir rappelé la classification anglo-saxonne, une classification légèrement remaniée des rickettsies pathogènes en quatre groupes : *Rickettsia* ; *Trombidixenus* ; *Coxiella* ; *Wolhynia*, et une classification à la fois parasitologique et clinique des rickettsioses : à poux et à puces ; à *Trombicula* ; à affinité pulmonaire ; à fièvre paroxystique ; enfin des animaux domestiques.

Ils distinguent parmi les rickettsies quatre types morphologiques ; ils font une bonne présentation, avec des planches et des clefs, des arthropodes vecteurs.

On peut critiquer certaines des opinions émises et une partie de l'ouvrage date légèrement ; mais au total, par le fond comme par la présentation, il s'agit d'un excellent manuel de travail, qui doit trouver sa place dans toutes les bibliothèques de microbiologie.

P. G.

**R. G. Harrison et M. J. Hoey.** — *The adrenal circulation*. 1 vol., 77 p., 54 fig., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1960. Prix : 25 s.

Les auteurs ont réuni dans cette monographie les observations et expériences qu'ils ont effectuées depuis 1957 et dont beaucoup n'avaient jamais été publiées. Ils décrivent d'abord les techniques qu'ils ont



employées et l'anatomie de la vascularisation des surrénales. Puis ils étudient les divers facteurs qui peuvent modifier cette vascularisation. Ils montrent, en particulier, que l'adrénaline ou d'autres agents vasoconstricteurs ont une action directe sur cette vascularisation, indépendamment de l'hypothalamus et de l'hypophyse. On sait l'importance croissante que prennent en clinique les perturbations du fonctionnement des surrénales, et le livre sera lu avec profit par les anatomistes, les endocrinologistes, les physiologistes, les biochimistes et les cliniciens.

H. T.

*Programme d'enseignement infirmier supérieur pour étudiantes étrangères. Organisation Mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques*, 1960, n° 199, 52 p. Prix : Fr. s. 2,- -, 3/6 ou \$ 0,60. Publié également en anglais et en espagnol. (Dépositaire pour la France, Librairie Masson, Paris.)

*II<sup>e</sup> Conférence africaine de la bilharziose. Rapport. Organisation Mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques*, 1960, n° 204, 44 p. Prix : Fr. s. 1,- -, 1/9 ou \$ 0,30. Publié également en anglais et en espagnol. (Dépositaire pour la France, Librairie Masson, Paris.)

*Groupe d'étude de la maladie de Chagas. Rapport. Organisation Mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques*, 1960, n° 202, 22 p. Prix : Fr. s. 1,- -, 1/9 ou \$ 0,30. Publié également en anglais et en espagnol. (Dépositaire pour la France, Librairie Masson, Paris.)

*Comité d'experts de la Rage. Quatrième rapport. Organisation Mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques*, 1960, n° 201, 30 p. Prix : Fr. s. 1,- -, 1/9 ou \$ 0,30. Publié également en anglais et en espagnol. (Dépositaire pour la France, Librairie Masson, Paris.)

*Répertoire mondial des centres de traitement pour maladies vénériennes dans les ports*, 2<sup>e</sup> édit. *Organisation Mondiale de la Santé*, 1961, 164 p. Prix : Fr. s. 5,- -, 8/6 ou \$ 1,75. Publication bilingue (en anglais et en français) [Dépositaire pour la France, Librairie Masson, Paris].

**L. Lison.** — *Histochimie et cytochimie animales. Principes et méthodes*. Vol. II, 3<sup>e</sup> édit., 443 p., 5 fig. Gauthier-Villars, édit., Paris, 1960. Prix : 45 NF.

Il s'agit du volume II de cette 3<sup>e</sup> édition, qui comprend la fin de la quatrième partie consacrée aux « Réactions spéciales », et qui étudie en six chapitres les glucides, glucoprotéines et mucoprotéines ; les lipides et lipoprotéines ; les enzymes ; les pigments ; divers produits organiques ; les éléments minéraux. Chaque chapitre comporte un index bibliographique. A la fin du volume, un important Appendice groupe une sélection des méthodes les plus courantes ou les plus utiles en histochimie (méthodes de préparation des tissus, autoradiographie, etc.).

Enfin l'ouvrage comprend une table des auteurs, une table analytique détaillée et une table des matières pour l'ensemble du volume I et du volume II. H. T.

**H. J. B. Atkins.** — *Tools of biological research. Second series.* 1 vol., 175 p., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1960. Prix : 37 s. 6 d.

Le premier Symposium sur le sujet s'était tenu en 1958, au Guy's Hospital, mais le domaine était si vaste et le nombre des questions qui durent être négligées si grand qu'un second Symposium eut lieu en 1959, tenant compte, en outre, des nouvelles découvertes faites entre temps. Ce sont les articles présentés à cette seconde réunion que contient le présent volume. Il traite, entre autres, de l'électro-encéphalographie, de la chromatographie sur papier, de la technique des anticorps fluorescents, de la phonocardiographie, de l'emploi des rayons X en biologie, etc. Chaque étude est rédigée par un spécialiste et comprend sa bibliographie et de nombreuses illustrations. H. T.

**G. Pincus et A. P. Vollmer.** — *Biological activities of steroids in relation to cancer.* 1 vol., 530 p., Academic Press, New York et Londres, 1960. Prix : \$ 15,00.

Ce volume contient les communications qui ont été présentées au Symposium organisé par le Cancer Chemotherapy National Service, aux Etats-Unis. Après une introduction d'ordre général sur les stéroïdes et le développement du cancer, le livre est divisé en quatre parties : structure et fonction des stéroïdes, métabolisme et biochimie, les stéroïdes et les tumeurs expérimentales, hormones et cancers humains. De très nombreux collaborateurs ont pris part, tant aux communications présentées qu'aux discussions qui ont suivi. Le fait principal qui en ressort est que le rôle des stéroïdes dans la genèse des tumeurs implique autre chose qu'une simple relation hormone-tissu ; de nombreux phénomènes d'ordre local ou général interviennent, qui doivent être pris en considération dans l'interprétation des résultats cliniques.

H. T.

*Lecture on the scientific basis of medicine.* Vol. VIII. 467 p., The Athlone Press, 1960. Prix : 45 s.

Ce 8<sup>e</sup> volume contient vingt-quatre des conférences qui ont été prononcées à la British Postgraduate Medical Federation, en 1958-1959. Les domaines envisagés sont très variés et l'on s'est attaché à sélectionner ceux dans lesquels des progrès particulièrement importants ont été réalisés. C'est ainsi qu'on trouvera des articles sur la microscopie électronique de la cellule vivante, la génétique des bactéries et la structure des gènes, la vaccination contre la poliomyélite, les adénovirus, la structure fine du collagène, la mesure de l'activité des surrénales chez l'homme, l'influence du fluor sur la carie dentaire, la nature des  $\gamma$ -globulines, etc. Chaque article comporte une courte bibliographie.

H. T.